

Beiträge zur Biosynthese von Arthropoden-Allomonen

Habilitationsschrift

zur Erlangung der venia legendi
vorgelegt
der Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von

WOLF-DIETRICH WOGGON

1986

Zürich ~~1985~~

Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Beiträge zur Biosynthese von Arthropoden-Allomonen

Habilitationsschrift

zur Erlangung der *venia legendi*

vorgelegt

der Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich

von

WOLF-DIETRICH WOGGON

Zürich 1985

Zentralstelle der Studentenschaft

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Vorbemerkungen	1
1. Einleitung	3
2. Die Biosynthese des Cantharidins	13
2.1. Einleitung und Problemstellung	13
2.2. Uebertragung des Cantharidins (<u>1</u>) von männlichen auf weibliche <u>Lytta vesicatoria</u> während der Kopulation	17
2.3. Cantharidintransfer in die Eigelege von <u>L. vesicatoria</u>	24
2.4. Optimierung von Inkorporations- versuchen	28
2.5. Die biosynthetisch aktive Drüse von <u>L. vesicatoria</u>	29
2.6. Intraspezifische Wechselwirkungen	34
2.7. Nachweis der spezifischen Inkorporation von 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat (2-(^3H , ^{14}C)- <u>13</u>)	38
2.8. Umwandlung von Farnesol (<u>14</u>) in Cantharidin (<u>1</u>)	54
2.8.1. Randomisierung der terminalen Methylgruppen von <u>14</u>	54
2.8.1.1. Synthese von E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-Farnesol (E,E-11'-(^3H , ^{14}C)- <u>14</u>)	56

2.8.1.2.	Einbauversuche mit E,E-11'- (³ H, ¹⁴ C)- <u>14</u> und E,E-11'-(³ H, ¹⁴ C)- 2- ¹⁴ C- <u>14</u>	63
2.8.2.	Ein Vorschlag zum Mechanismus der Umwandlung von Farnesol (<u>14</u>) in Cantharidin (<u>1</u>)	68
2.9.	Bildung des Biosynthesezwischen- produktes Farnesol (<u>14</u>)	73
2.9.1.	Einleitung	73
2.9.2.	Abbaumethoden zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den terminalen Methylgruppen von (¹⁴ C)- Farnesol ((¹⁴ C)- <u>14</u>)	80
2.9.3.	Inkorporation von 2- ¹⁴ C-Mevalonat (2- ¹⁴ C- <u>13</u>)	82
2.9.4.	Synthese und Inkorporation von 3'- ¹⁴ C-Mevalonat (3'- ¹⁴ C- <u>13</u>)	87
3.	Mechanistische und präparative Aspekte der stereo- und regioselektiven Funktionalisie- rung allylischer Methylgruppen	93
3.1.	Darstellung ¹³ C-markierter Olefine für mechanistische Untersuchungen	93
3.2.	Bildung und Struktur acyclischer π -Allyl-Pd-Komplexe	97
3.3.	Allyloxidation mit SeO ₂	110

3.4.	Darstellung und spektroskopische Eigenschaften von Estern der selenigen Säure	120
3.4.1.	Einleitung	120
3.4.2.	Diäthylselenit (<u>105</u>)	121
3.4.3.	(4R,5R)-4,5-Dimethyl-1,3,2-dioxaselenolan-2-oxid (<u>107</u>)	123
3.4.4.	1,10,10-Trimethyl-3,5-dioxa-4-selena-tricyclo $[5.2.1.0^2,6]$ decan-4-on (<u>111</u>)	124
3.4.5.	2-N,N-Dimethyl-N-oxido-2-methylpropoxy-seleninsäure (<u>52</u>)	128
3.4.6.	^{77}Se -NMR-Spektroskopie von Estern der selenigen Säure	129
3.4.7.	Pyramidale Inversion am Se in Verbindungen vom Strukturtyp SeX_3E	135
3.4.8.	Allyloxidation mit Estern der selenigen Säure	140
3.4.9.	Stereoselektivität der Allyloxidation mit Estern der selenigen Säure	145
4.	Die Biosynthese des Iridodials (<u>3</u>)	150
4.1.	Einleitung, Problemstellung und Zielsetzung	150
4.2.	Synthesen des nicht natürlich vorkommenden (1R)-Iridodials (<u>133</u>)	153

4.3.	Abbau von (1R)-Iridodial (<u>133</u>) via (+)-Isoiridomyrmecin (<u>134</u>)	156
4.4.	Inkorporation von 2- ¹⁴ C-Mevalonat (2- ¹⁴ C- <u>13</u>) in <u>Tapinoma nigerrimum</u> (<u>Dolichoderinae</u>)	159
5.	Die Biosynthese des Coccinellins (<u>2</u>)	161
5.1.	Einleitung und Problemstellung	161
5.2.	Inkorporation von 2- ¹⁴ C-Acetat in <u>Coccinella septempunctata</u> (<u>Coccinellidae</u>)	164
	Zusammenfassung	169
	Dank	176
	Literaturverzeichnis	177

Allgemeine Vorbemerkungen

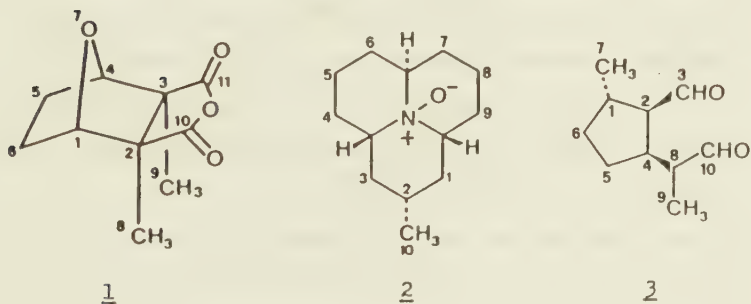
Experimentelle Details werden nur angegeben, wenn es sich um neue Beobachtungen, Reaktionen oder wesentliche Änderungen bereits publizierter Arbeitsvorschriften handelt. Spektroskopische Daten werden nur dann diskutiert bzw. in den Schemata an den Formeln angebracht, wenn es sich entweder um neue Verbindungen oder solche handelt, für die eine entsprechende Analyse noch nicht publiziert ist. In diesem Zusammenhang gilt, wenn nicht anders angegeben, dass ^1H -, ^{13}C - und ^{77}Se -NMR-Spektren in CDCl_3 aufgenommen wurden; die chemischen Verschiebungen (ppm) beziehen sich auf TMS bzw. $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, ihre Zuordnung an den Formel wird mit einem Pfeil $\curvearrowright$ markiert, während die Kopplungskonstanten J (Hz) mit einem Doppelpfeil $\longleftrightarrow$ bezeichnet sind. Gaschromatographische Analysen (GC) wurden entweder an den Kapillarsäulen XE60 oder SE52 vorgenommen. Neben den Abkürzungen SC (Säulenchromatographie), DC (Dünnschichtchromatographie), präp. DC (präparative Dünnschichtchromatographie) werden die üblichen Abkürzungen für Lösungsmittel und Reagenzien verwendet, die auch in Fieser & Fieser's „Reagents for Organic Synthesis“, John Wiley & Sons, New York, Bände 1-10, gebraucht werden. Die Nomenklatur radioaktiver Verbindungen wurde so gewählt, dass das Nuklid vor der Formelnummer der inaktiven Verbindung steht. Bei synthetischen radioaktiven Verbindungen wird die Position

der Markierung angegeben, bei biosynthetisierten Substanzen und deren Abbauprodukten wird darauf verzichtet und das Nuklid in Klammern gesetzt. Dadurch werden zu lange Formelbezeichnungen und eine Unterscheidung zwischen nachgewiesener und vermuteter Radioaktivitätsverteilung im biosynthetisierten Naturstoff vermieden. Biosynthetisierte Verbindungen unterschiedlicher spezifischer Aktivität werden durch einen oder mehrere Sterne * gekennzeichnet, während unterschiedliche ^{14}C - bzw. ^3H , ^{14}C -Verteilungen durch Buchstaben a, b, c... nach der Formelnummer angegeben sind.

1. Einleitung

Die in der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Biosynthese behandelten Arthropoden-Inhaltsstoffe Cantharidin (1), Coccinellin (2) und Iridodial (3), s. Schema 1, gehören entsprechend ihrer Funktion zu den Allomonen.

Schema 1



Als Allomone ^{1, 2)} werden chemische Verbindungen bezeichnet, die der interspezifischen Wechselwirkung dienen und dadurch dem produzierenden Organismus einen ökologischen Vorteil verschaffen. Pheromone sind dagegen nach Karlson & Lüscher ³⁾ definiert als Arthropoden-Inhaltsstoffe, die die intraspezifischen Kommunikationen regulieren.

Die Einführung dieser und weiterer Begriffe erwies sich als notwendig in Zusammenhang mit der Reindarstellung des Bombykols (4), s. Schema 2, als eine an der Funktion orientierte Abgrenzung gegenüber dem Begriff des Hormons.

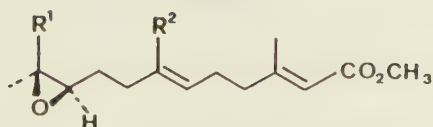
Schema 2



Seit der Isolierung des Bombykols (4), des Sexualpheromons des Seidenspinners Bombyx mori, durch Butenandt ⁴⁾ im Jahre 1959 ist ein ständig wachsendes Interesse von seiten der organischen Chemiker an Arthropoden-Inhaltsstoffen zu verzeichnen, wobei die Impulse für diese Untersuchungen nicht nur aus der Grundlagenforschung kommen, sondern auch ökologisch und ökonomisch im Hinblick auf eine biologische Schädlingsbekämpfung motiviert sind ^{5, 13)}.

Die Entwicklung wurde einerseits wesentlich beschleunigt durch intensive Zusammenarbeit mit Biologen ⁵⁾ und andererseits durch Fortschritte bei der Entwicklung hochauflösender NMR-Geräte, der Kapillargaschromatographie sowie der Hochdruckflüssigchromatographie. Hatten die Arbeiten am Bombykol noch 20 Jahre in Anspruch genommen und etwa 10^6 Seidenspinnerdrüsen erfordert ⁶⁾, so wurden für die Reindarstellung und Strukturaufklärung der drei Juvenilhormone 5, 6, und 7 durch Röllner ⁷⁾, Meyer ⁸⁾ und Judy ⁹⁾, s. Schema 3, „nur“ etwa 10^3 Organismen während 10 Jahren benötigt.

Schema 3



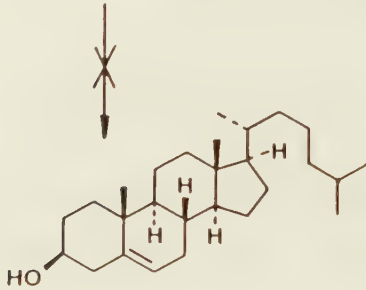
- $\underline{5}$ $R^1=R^2 = -CH_2-CH_3$
 $\underline{6}$ $R^1 = -CH_2-CH_3, R^2 = -CH_3$
 $\underline{7}$ $R^1=R^2 = -CH_3$

Dieser zweite Höhepunkt in der Chemiegeschichte der Arthropodeninhaltsstoffe motivierte insbesondere die synthetisch arbeitenden organischen Chemiker, und es wurden eine Reihe von Verfahren zur stereospezifischen Synthese von Olefinen entwickelt ^{5,10)}, die u.a. auch erfolgreich auf die Synthese von Pheromonen und Allogenomen angewendet wurden. In Uebersichtsartikeln von Rossi¹¹⁾, Baker¹²⁾ und Mori¹³⁾ werden diese Arbeiten ausführlich dokumentiert.

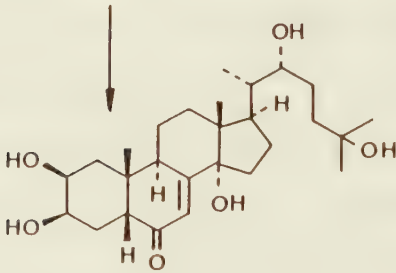
Im Vergleich dazu sind die Aktivitäten in der Biosyntheseforschung weit weniger ausgeprägt. Für die Arthropodenhormone sind zwei Beispiele erwähnenswert. Durch die frühen Arbeiten zur Biosynthese des α - und β -Ecdysons (8) und (9) von Karlson ¹⁴⁾, Koreeda ¹⁵⁾ und Horn¹⁶⁾ wird eindeutig belegt, dass eine de novo Biosynthese der Häutungshormone nicht erfolgt, sondern Cholesterin (10) als essentieller Bestandteil der Nahrung benötigt wird ¹⁷⁾, s. Schema 4.

Schema 4

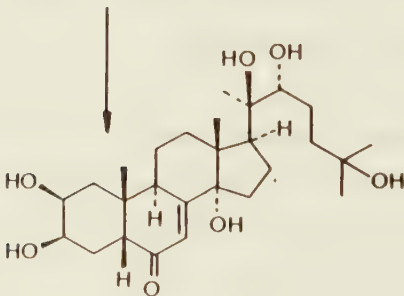
Acetat / Mevalonat



10



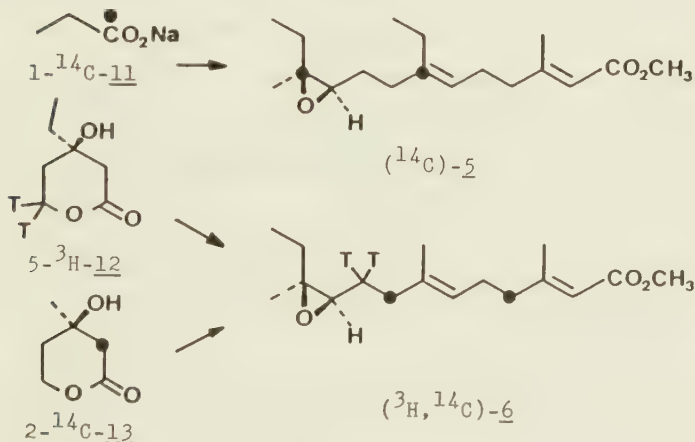
8



2

Für die Juvenilhormone (5) und (6) konnten Schooley ^{18,19} und Peter ²⁰ zeigen, dass diese Verbindungen, gemäss Schema 5, aus Propionat (11), Homomevalonat (12) und Mevalonat (13) aufgebaut werden.

Schema 5



Der Metabolismus von Arthropodenpheromonen und -allomonen ist an einer ganzen Reihe von Verbindungen untersucht worden, aber, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, ist nur in den wenigsten Fällen eine de novo Biosynthese eindeutig nachgewiesen worden. Ein grosses Handicap bei derartigen Experimenten stellen ohne Zweifel die im allgemeinen sehr kleinen Einbauraten ($< 1\%$) dar, die eine Verwendung von NMR-aktiven Kernen wie ^2H und ^{13}C ausschliessen. Das hat zur Folge, dass zum sicheren Nachweis einer Biosynthesesequenz aufwendige chemische und/

oder enzymatische Abbaureaktionen des isolierten, radioaktiven Naturproduktes notwendig sind, die ihrerseits eine genügend hohe spezifische Aktivität voraussetzen.

Letztlich bleiben bei Versuchen mit intakten Organismen selbst bei positiven Einbauresultaten gewisse Zweifel an der Aussagekraft bestehen, da ohne Experimente mit Zellkulturen oder wenigstens mit dem isolierten, biosynthetisch aktiven Organ eine Beteiligung von Mikroorganismen am Metabolismus nicht auszuschliessen ist, s. Tabelle 1 ²¹⁾. Die Interpretation eines negativen Einbauresultates ist ebenso schwierig, da die Experimente sehr von der Applikationstechnik abhängig sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt das gesamte Spektrum der Problematik : im Fall der Biosynthese des Cantharidins (1), einer relativ fortgeschrittenen Untersuchung, ist zur Lösung wichtiger Details die Ausarbeitung komplizierter Abbaumethoden inklusive mechanistischer Studien metallorganischer Reaktionen erforderlich. Demgegenüber bleiben die Untersuchungen zur Biosynthese des Coccinellins (2) und Iridodials (3) in den Anfängen stecken, da vermutlich mangels geeigneter Applikationsbedingungen keine genügend hohen bzw. unspezifische Inkorporationen plausibler Vorläufer in die Allomone auftreten.

Tabelle 1. Untersuchungen zur Biosynthese von Arthropodenpheromonen und -allomonen*

Arthropoden	Applizierter Vorläufer	Pheromon/Allomon	Vorläuferinkorp. spez. unspez. de novo	Biosynthese** Nahrung
<u>Ips paraconfusus</u> (<u>Scolytidae</u>) 	21)  $\longrightarrow$  $\longrightarrow$ 	Myrcen (+)-Ipsdienol (-)-Ipsenol	++ - - ++	
<u>Ips paraconfusus</u> (<u>Scolytidae</u>) $\varnothing + \sigma$	22)  $\longrightarrow$  + 	Keine Experimente mit isotopmarkierten Vorläufern		vermutlich synth. durch B.cereus im Darm von I.p.
<u>Acanthomyons</u> <u>Claviger</u> (<u>Formicidae</u>)	23) 1- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Mevalonat	 + 	nicht bestimmt	?
<u>Anisomorpha</u> <u>buprestoides</u> (<u>Phasmidae</u>)	24) 2- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Malonat 2- ¹⁴ C-Mevalonat	(-)-Citronellal Citral 	nicht bestimmt	?

Anisomorphanal

Tabelle 1., Fortsetzung

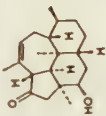
Arthropoden	Applizierter Vorläufer	Pheromon/Allomon	Vorläuferinkorp. spez. unspez.	Biosynthese de novo Nahrung**
<u>Samia cynthia</u> 25) (<u>Saturniidae</u>)	2- ¹⁴ C-Mevalonat	 Farnesol	nicht bestimmt	?
<u>Lasius</u> 26) <u>fuliginosus</u> (<u>Formicidae</u>)	1- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Mevalonat	 Farnesal	+	?
		 Dendrolasin	-?	?
<u>Nasutitermes</u> 27) <u>octopilis</u> (<u>Termitidae</u>)	1- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Mevalonat	 3-Hydroxykempenon	nicht bestimmt	?
<u>Argyrotaenia</u> 28) <u>velutinana</u> (<u>Tortricidae</u>)	1- ¹⁴ C-Acetat	 Tetradeceenylacetat	nicht bestimmt	?

Tabelle 1., Fortsetzung

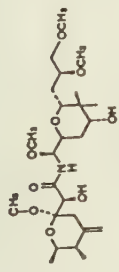
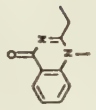
Arthropoden	Applizierter Vorläufer	Pheromon/Allomon	Vorläuferinkorp. spez. unspes.	Biosynthese ..
<u>Paederus</u> 29) <u>fuscipes</u> (<u>Staphylinidae</u>)	1- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Acetat		+? -? ? ?	de novo Nahrung
<u>Glomeris</u> 30) <u>marginata</u> (<u>Glomeridae</u>)	1- ¹⁴ C-Anthranil-säure		+ - ? ?	?
<u>Elaeodes</u> 31) <u>longicollis</u> (<u>Tenebrionidae</u>)	U- ¹⁴ C-Tyrosin 2- ¹⁴ C-Acetat 2- ¹⁴ C-Propionat 2- ¹⁴ C-Malonat	Homoglomerin  	nicht bestimmt ? ? + -	?

Tabelle 1., Fortsetzung

Arthropoden	Applizierter Vorläufer	Pheromon/Allozon	Vorläuferinkorp. spez. unabez.	Biosynthese de novo Nahrung**
<u>Harpaghe</u> ³²⁾ <u>haydeniana</u> (<u>Polydesmidae</u>)	2- ¹⁴ C-3- ¹⁴ C-Phenylalanin	 + HCN	+ - - +	+ - - +
<u>Carabus taedatus</u> ³³⁾ (<u>Carabidae</u>)	4- ¹⁴ C-Valin		+ - - ?	? - - ?
<u>Casponotus</u> ³⁴⁾ <u>Dennsylvanicus</u> (<u>Formicidae</u>)	U- ¹⁴ C-Serin 2- ¹⁴ C-Glycin 14C-Methylen-tetrahydrofolsäure	HCOOH	+ - - ?	? - - ?

* Die Verbindungen 1, 2 und 3 sind in diese Tabelle nicht aufgenommen.
** Biosynthese aus strukturverwandten Verbindungen, die in der Nahrung enthalten sind.
+ Stabile Markierung, spektroskopischer Nachweis der Inkorporation.
+ Radioaktive Markierung im Pheromon/Allozon durch Abbau lokalisiert.
+/-? Das radioaktive Pheromon/Allozon wurde abgegeben, aber die Resultate lassen keine eindeutige Aussage über die Spezifität des Vorläufers zu.

2. Die Biosynthese des Cantharidins

2.1. Einleitung und Problemstellung

Cantharidin (1) gehört zu den am längsten bekannten Insektenabwehrstoffen, es wurde bereits 1810 von M. Robiquet ³⁵⁾ als farblose kristalline Verbindung aus Lytta vesicatoria, der sog. Spanischen Fliege, isoliert und später noch in zahlreichen anderen Genera der Käferfamilie Meloidae nachgewiesen ³⁶⁾. Nach Angaben von Beauregard ³⁷⁾ ist die Verbindung sowohl aus der Hämolymphe und den Weichteilen männlicher und weiblicher L. vesicatoria isolierbar als auch in den Eigelegen und Larvenstadien zu finden. Während die Meloiden früher über einen grossen Teil Mitteleuropas verbreitet waren ³⁸⁾, findet man heute grössere Populationen nur noch im Mittelmeerraum, wo sie für etwa 4 Wochen (Mai/Juni) in Schwärmen auftreten, sich von den Blättern der Olive ernähren und dadurch lokal zu einer Bedrohung der Kulturpflanzen werden.

Das Verteidigungsverhalten der Meloiden äussert sich als "Reflex-Bleeding" ³⁹⁾, d.h. bei einem Angriff wird zwischen Tibia und Femur oder gelegentlich auch am Abdomen und den Antennen ein Tropfen cantharidinhaltige Hämolymphe abgegeben. Die Wirksamkeit des Cantharidins (1) als Abwehrstoff hängt demzufolge von der Angriffs-

technik der natürlichen Feinde ab. Handelt es sich dabei um Ameisen und Spinnen, die zunächst mit dem Opfer Kontakt durch Berührung aufnehmen, so ist das Reflex-Bleeding eine sehr wirksame Verteidigungsform: im Kontakt mit der cantharidinhaltigen Hämolymphe lassen die Angreifer von den Meloiden ab, beginnen sich zu putzen und geben dem Opfer Gelegenheit zu fliehen. Dieses Phänomen wird von Eisner und Carrel ⁴⁰⁾ mit dem Begriff "Feeding-Deterrent" umschrieben. In Laborversuchen wurde nachgewiesen ⁴¹⁾, dass bereits 10^{-5} molare Cantharidin-Lösungen einen signifikanten Feeding-Deterrent-Effekt bei Formica exsectoides und Calosoma prominens (Coleoptera) auslösen.

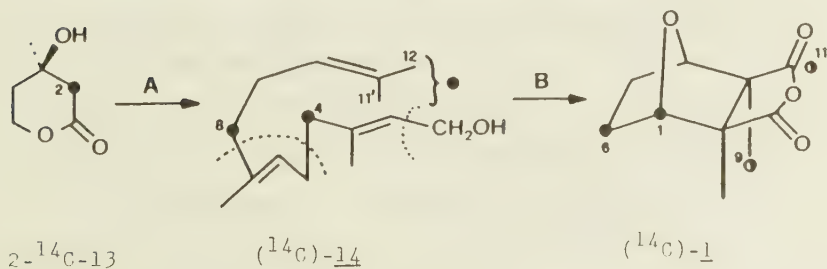
Werden die Meloiden aber von Kröten, Eidechsen und Vögeln angegriffen, die im allgemeinen sofort ihre Opfer verschlucken, so stellt das Reflex-Bleeding nur dann eine für die gesamte Spezies erfolgreiche Abwehr dar, wenn bedingt durch die Toxizität des Cantharidins (1) im angreifenden Organismus Lerneffekte erzielt werden. Offenbar ist die Toxizität von 1 je nach Organismus sehr unterschiedlich ausgeprägt. In Versuchen mit Wachteln (Coturnix japonica) hat sich gezeigt ⁴¹⁾, dass orale Dosen von 400 mg 1/kg problemlos vertragen werden. Dagegen führen orale Dosen von 0,5 mg 1/kg bei Säugetieren zu schwerer Gastroenteritis und durch Nierenversagen zum Tod ⁴²⁾. Fälschlicherweise ist dem Cantharidin die

Wirkung eines Aphrodisiakums zugeschrieben worden, was dazu geführt hat, dass trotz der hohen Toxizität die getrockneten Spanischen Fliegen seit dem Mittelalter als Stimulanz gehandelt werden ^{43,44)}.

Aufgrund seiner Struktur war Cantharidin vom synthetischen Standpunkt ein Zielmolekül zur Anwendung von $[4+2]$ -Cycloadditionen. Das kommt sowohl in den frühen Arbeiten von Ziegler ⁴⁵⁾ und Storck ⁴⁶⁾ zum Ausdruck als auch in der kürzlich erschienenen Mitteilung von Dauben ⁴⁷⁾, in der über die erfolgreiche Anwendung einer Diels-Alder-Reaktion bei hohem Druck zur Synthese von 1 berichtet wird.

Zur Biosynthese des Cantharidins sind Experimente mit radioaktivem Acetat ^{48,49)}, Mevalonat ^{48,49, 50)} sowie synthetischen ³H- und ¹⁴C-markierten Geraniol- und Farnesol-Präparaten ^{51,52,53)} durchgeführt worden; so dass zu Beginn der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche die in Schema 6 dargestellte Biosynthesesequenz für den terpenoiden Ursprung von Cantharidin als gesichert gelten konnte.

Schema 6



Frühere Untersuchungen hatten ausserdem gezeigt, dass während der Larvenstadien Cantharidin biosynthetisiert wird ⁵⁴⁾, und dass im Gegensatz zu den adulten, männlichen Lytta vesicatoria die adulten, weiblichen Insekten nicht fähig sind, aus terpenoiden Vorläufern Cantharidin zu synthetisieren, obwohl die in der Natur gesammelten weiblichen Käfer das Allomon enthalten ⁴⁸⁾.

Daraus ergaben sich folgende Problemstellungen:

- 1.) Abklärung der Herkunft des Cantharidins in den weiblichen Lytta vesicatoria;
- 2.) Identifizierung der bezüglich der Cantharidin-Biosynthese aktiven Drüse in männlichen Lytta vesicatoria;
- 3.) Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung im Cantharidin ($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-1 nach Applikation von 2-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-Mevalonat (2-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-13) mit Hilfe eines Abbaus, der die Unterscheidung enantiotoper C-Atome des Cantharidins erlaubt;
- 4.) Nachweis derjenigen Reaktionssequenz, A oder/und B, s. Schema 6, die verantwortlich ist für die Verteilung der Radioaktivität (Randomisierung) auf C-9 und C-11 des Cantharidins nach Applikation von 2- ^{14}C -Mevalonat (2- ^{14}C -13) und
- 5.) eine mechanistische Deutung der Umwandlung von Farnesol (14) in Cantharidin (1) auf Grund der experimentellen Ergebnisse.

2.2. Uebertragung des Cantharidins (1) von männlichen
auf weibliche *Lytta vesicatoria* während der
Kopulation

Eine wichtige Voraussetzung zur Aufklärung von Biosynthesevorgängen sind möglichst hohe Einbauraten, die nur erzielt werden, wenn eine hinreichende Kenntnis des biologischen Systems vorhanden ist. Im Fall der Meloiden gab es ein wesentliches Problem, von dessen Lösung wir uns einen günstigen Einfluss auf die Biosyntheseuntersuchungen versprochen.

Die Meloiden-Population, die man jeweils Ende Mai in Sizilien sammeln konnte, wies einen Ueberschuss an weiblichen Insekten von 10 : 1 auf, die, obwohl sie nachweislich kein Cantharidin biosynthetisieren können ⁴⁸⁾, einen Cantharidin-Gehalt von 1% ihres Trockengewichtes besaßen. Im Durchschnitt enthielten die männlichen *Lytta vesicatoria* dieser Population 1,8% Cantharidin ⁵⁵⁾.

Die Klärung dieses scheinbaren Widerspruchs wurde ausgelöst durch Beobachtungen des Insektenverhaltens während der Biosyntheseuntersuchungen. Das übliche Vorgehen bei diesen Versuchen bestand darin, eine

Anzahl von 10-20 männlichen *Lytta* aus der Population auszuwählen und für die Injektion der Vorläufer in Kristallisierschalen zu transferieren, die zur Fütterung Eschenblätter (*Fraxinus excelsior*) enthielten. Die Injektion der radioaktiven Vorläufer erfolgte unter CO₂-Narkose mit feinen Glaskapillaren lateral auf der Höhe des achten Abdominalsegmentes in Form wässriger Lösungen, bei Natriummevalonat, oder unverdünnt im Fall der synthetischen Terpene. Nach Kurzer Erholungsphase schienen sich die Insekten zwar wieder normal zu verhalten, aber man hatte den Eindruck, dass trotz vorsichtigster Applikationstechnik die durchschnittliche Ueberlebensdauer von 36 Stunden um mindestens den Faktor 4 kleiner war als bei den männlichen *Lytta*, die in der Gesamtpopulation verblieben waren. Ausserdem beobachtete man, dass die männlichen Käfer versuchten, miteinander zu kopulieren und die zufällige Anwesenheit von weiblichen Käfern bei einem Injektionsexperiment eine rege heterosexuelle Kopulationstätigkeit zur Folge hatte. Dieser Vorgang dauerte nach einer Vorphase von 15-30 Minuten insgesamt 20-24 Stunden. Anschliessend verweigerten die bereits befruchteten weiblichen *Lytta* trotz intensiver Bemühungen der männlichen Tiere in einer prolongierten Vorphase jede weitere Kopulation durch eine entsprechende Körperhaltung. Im Gegensatz dazu kopulierten die männlichen Insekten im Abstand von 6±2 Tagen.

Wir kamen daraufhin zur Ueberzeugung, dass unsere ursprüngliche Separierungspraxis eher unnatürlich war und gaben dann jeweils einen deutlichen Ueberschuss an weiblichen Tieren zu den mit Vorläufern behandelten männlichen Käfern, mit dem Resultat, dass die mittlere Ueberlebensdauer nach Injektion auf 100 Stunden anstieg und die spezifische Aktivität der biosynthetisierten Cantharidine ebenfalls höher ausfiel.

In diesem Versuchsstadium begannen wir zu vermuten, dass zwischen der geschlechtsspezifischen Biosyntheseaktivität der Meloiden und der Kopulation ein Zusammenhang besteht. Man injizierte demzufolge die radioaktiven Vorläufer E,E-11'-(³H,¹⁴C)-14 und E,E-2-¹⁴C-Farnesyssäuremethylester (E,E-2-¹⁴C-15) zunächst in männliche Insekten "in copula". Die Käfer setzten die Kopulationen ungehindert während 20±2 Stunden fort und wurden nach der Trennung noch weitere 30-40 Stunden am Leben gehalten. Anschliessend arbeitete man die weiblichen und männlichen *Lytta* getrennt auf und stellte fest, dass beide Cantharidinpräparate radioaktiv waren. Die Resultate sind in Tabelle 2 wiedergegeben und dokumentieren einen Transfer von biosynthetisiertem Cantharidin von den männlichen in die weiblichen Meloiden.

Da nicht auszuschliessen war, dass die männlichen *Lytta* nach der Kopulation die Biosynthese von Cantharidin aus

den noch vorhandenen Vorläufern fortsetzen, und damit die Transferwerte von 28,7% bzw. 45,0% zu klein bestimmt werden, wurde in einem weiteren Versuch 2-(^3H , ^{14}C)-13 24-30 Stunden vor der Kopulation männlichen Lytta injiziert und die Paare direkt nach einer durchschnittlichen Kopulationsdauer von 20-24 Stunden getötet. Die aus den männlichen und weiblichen Insekten isolierten Cantharidine deuten auf einen nahezu quantitativen Transfer des aus Mevalonat von den männlichen Lytta biosynthetisierten Cantharidins hin, s. Tabelle 3. Bemerkenswert ist die gute Uebereinstimmung der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse beider Cantharidinproben und die Tatsache, dass bis zu 69% der mit dem Ejakulat in die weiblichen Lytta übertragenen Radioaktivität dem Cantharidin zuzuordnen ist. Zur weiteren Absicherung dieses Befundes wurde dann (^3H , ^{14}C)-markiertes Cantharidin aus früheren Biosyntheseversuchen in Aceton gelöst männlichen Lytta während der Kopulation injiziert und die Tiere nach einer nur 4-8 Stunden dauernden Kopulation getötet. Das Cantharidin der männlichen Lytta wurde durch Ganzkörperextraktion gewonnen (ohne Zugabe von inaktivem 1), während den weiblichen Käfern Ovarien und Receptacula zur Cantharidinbestimmung entfernt wurden. Wie in Tabelle 4 dargestellt ist, sind 10,3% des in die männlichen Lytta injizierten, radioaktiven Cantharidins in den Genitalapparat der weiblichen Insekten transferiert worden.

Tabelle 2*

Experiment mit E,E-11'-(³ H, ¹⁴ C)-Farnesol (E,E-11'-(³ H, ¹⁴ C)-14) - ³ H/ ¹⁴ C : 21,0						
Lytta vesicatoria (Paare)	Isotop	Total- aktivität (dpm)	Cantharidin		³ H/ ¹⁴ C	Cantharidin- Transfer (%)
			(dpm/mg)	Totalakt. (dpm)		
4	♂	³ H	3,1x10 ⁷	33 856	1,69x10 ⁶	9,67
		¹⁴ C	9,3x10 ⁵	3 500	1,75x10 ⁵	
	♀	³ H	1,5x10 ⁷	28 021	1,40x10 ⁶	9,75
		¹⁴ C	3,2x10 ⁵	2 873	1,44x10 ⁵	
Experiment mit E,E-2- ¹⁴ C-Farnesylsäuremethylester (E,E-2- ¹⁴ C-15)						
7	♂	¹⁴ C	1,0x10 ⁸	23 507	1,18x10 ⁶	2,9
		¹⁴ C	3,0x10 ⁶	9 486	4,74x10 ⁵	
						28,7

* E,E-2-¹⁴C-15 wird in gleicher Weise in Cantharidin eingebaut wie E,E-2-¹⁴C-Farnesol (E,E-2-¹⁴C-14), s. 2.8.1.2. Zur Spezifität der Inkorporation von E,E-11'-(³H, ¹⁴C)-14 s. 2.8.1.2.

Tabelle 1 *

Experiment mit 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat (2-(^3H , ^{14}C)-13) - $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 4,75

Injektions- materialien (Paare)	Isotop	Total- aktivität (dpm)	Cantharidin		$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Transferierte Totalaktivität (%)	Cantharidin- Transfer (%)
			(dpm/mg)	Totalakt. (dpm)			
5	^3H	$6,5 \times 10^6$	1 087	$5,51 \times 10^4$	2,12	19,8	92,8
	^{14}C	$1,2 \times 10^6$	512	$2,60 \times 10^4$			
	^3H	$1,6 \times 10^6$	14 025	$7,14 \times 10^5$	2,32	33,0	92,3
	^{14}C	$5,9 \times 10^5$	6 035	$3,07 \times 10^5$			
9	^3H	$5,5 \times 10^6$	715	$3,23 \times 10^4$	2,27	38,9	98,3
	^{14}C	$9,9 \times 10^5$	315	$1,42 \times 10^4$			
	^3H	$3,5 \times 10^6$	38 000	$1,72 \times 10^6$	2,24	52,6	98,2
	^{14}C	$1,1 \times 10^6$	16 952	$7,66 \times 10^5$			

* Zur Spezifität der Inkorporation von 2-(^3H , ^{14}C)-13
s. 2.7.

Tabelle 4

Experiment mit (^3H , ^{14}C)-Cantharidin ($(^3\text{H}$, $^{14}\text{C})$ -I*)

<u>Lytta</u> <u>vesicatoria</u> (Paare)	Isotop	Injiziertes Cantharidin		Isoliertes Cantharidin		Cantharidin-	
		(mg)	Spez. Akt. (dpm/mg)	(mg)	Spez. Akt. (dpm/mg)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Transfer (%)
25	^3H	5,42	115 619	15,25	36 850	10,04	
	^{14}C				3 668		
	^3H			20,62	3 122	9,97	10,3
	^{14}C				313		

Mit diesem Resultat wird bewiesen, dass tatsächlich Cantharidin mit dem Ejakulat transportiert wird und mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen, dass die männlichen Lytta ein für die weiblichen Insekten zur Cantharidin-Produktion verwendbares unbekanntes Biosynthese-Zwischenprodukt zur Verfügung stellen ^{fl)}.

2.3. Cantharidintransfer in die Eigelege von L. vesicatoria

Es war nun naheliegend zu prüfen, ob das Cantharidin, das mit dem Sperma in das Receptaculum der weiblichen Insekten gelangt, bei der Befruchtung in das Ovar übertragen wird. Zu diesem Zweck injizierte man 2-(³H,¹⁴C)-Mevalonat (2-(³H,¹⁴C)-13) in männliche Lytta vor der Kopulation und sammelte 10-12 Tage nach erfolgter

fl)

Kurz vor Abschluss der hier vorgestellten Experimente wurde uns mitgeteilt, dass in der Arbeitsgruppe von Eisner ⁵⁶⁾ die gleiche Problematik mittels GC-analytischer Bestimmung der Cantharidin-Konzentration in männlichen und weiblichen Epicauta amaicha (Meloidae) vor und nach Kopulation bearbeitet wurde. Die Resultate von Carrel und Eisner ⁴¹⁾ sind qualitativ identisch mit unseren und bestätigen unsere Interpretation des Verhaltens von Lytta vesicatoria.

Kopulation die Eigelege und die entsprechenden weiblichen Insekten. Die Gelege bestehen im Durchschnitt aus 120 hellgelben, ovalen Eiern, die durch eine farblose Gallerte in Form einer Traube zusammengehalten werden und an Blätter angeheftet oder, wenn möglich, im Boden vergraben werden. Die weiblichen Lytta starben im allgemeinen innerhalb der nächsten 8 Stunden nach der Eiablage und wurden auf Cantharidin aufgearbeitet. Durch wiederholtes Waschen der Eigelege mit 95 proz. Alkohol wurde die Cantharidinmenge in der Gallerte bestimmt, s. Tabelle 5. Anschliessend wurden die Eier zerstört, um den Cantharidingehalt im Inneren zu ermitteln. Es stellte sich heraus, dass bis zu 47% des während der Kopulation auf die Weibchen übertragenen Cantharidins bei der Befruchtung an die gesamte Eimasse weitergegeben werden, wovon in der Gallerte 6-9% und im Inneren der Eier 91-94% vorhanden sind⁵⁷⁾.

Ohne Zweifel ist mit diesen Resultaten ein aussergewöhnlicher Arthropoden-"Stoff-Wechsel" dokumentiert: ein für das Ueberleben der Population offensichtlich wichtiger Abwehrstoff wird nur von einem Teil dieser Population de novo produziert und durch die Kopulation dem anderen Teil zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5

Cantharidin - Transfer in die Eigelege von Lytta vesicatoria

<u>Lytta vesicatoria</u>	Cantharidin ^3H	Totalaktivität ^{14}C	(dpm)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
4 ♀ [*]	$2,06 \times 10^5$	$9,48 \times 10^4$	52,1%	2,17
Eigelege- Oberfläche	$1,65 \times 10^4$	$7,60 \times 10^3$	4,3%	2,17
Eierinhalt	$1,63 \times 10^5$	$7,96 \times 10^4$	42,3%	2,06
Summe	$3,85 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	100%	100%

*

Den männlichen Lytta vesicatoria wurde 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat
(2-(^3H , ^{14}C)-12), $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 4,75, injiziert.

Man könnte noch argumentieren, dass die weiblichen *Lytta* diesen Schutz nicht unbedingt benötigen, da sie den Vorteil durch die Mimikry haben; das gilt aber nicht für die Eigelege und sicher auch nicht für die Larvenstadien, welche wegen ihrer komplizierten Entwicklung einem starken ökologischen Druck ausgesetzt sind ^{f2)}.

f2)

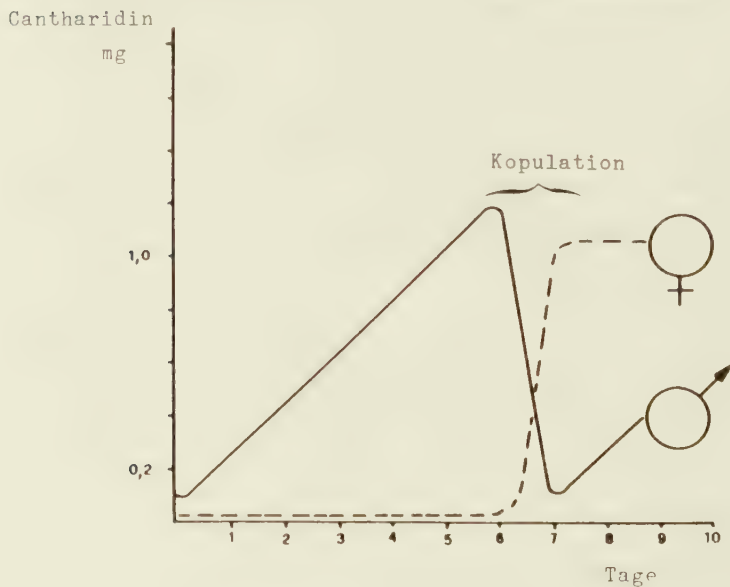
Die larvale Entwicklung von *Lytta vesicatoria* umfasst insgesamt sieben Larvenstadien. Das erste Stadium wird als Triunguline bezeichnet und stellt eine sehr agile, mit bewehrter Kopfkapsel versehene, pigmentierte Larve dar. Auf dieser Stufe beginnt eine erste Selektion im Kampf um die Nahrung aus der restlichen Eimasse, bei der mindestens 25% der Larven nicht überleben ⁵⁷⁾. Die kräftigsten Individuen suchen dann Nester von solitär lebenden Hymenopteren, häufig durch Phoresie, an denen die 10 Monate dauernde Entwicklung bis zum adulten Insekt erfolgt ⁵⁸⁾.

2.4. Optimierung von Inkorporationsversuchen

Für unsere weiteren Einbauversuche, s. 2.7 und 2.8.1, waren die oben beschriebenen Resultate insofern von Bedeutung, als sie eine Optimierung der Versuchsbedingungen gestatten. Aus der Tatsache, dass die männlichen *Lytta* das von ihnen biosynthetisierte Cantharidin praktisch quantitativ an die weiblichen Insekten weitergeben und ein Kopulationsintervall von 6 ± 2 Tagen einhalten, lässt sich der zeitliche Verlauf der Cantharidinkonzentration in männlichen und weiblichen *L. vesicatoria* herleiten, s. Abbildung 1⁵⁷⁾.

Abbildung 1

Cantharidin-Konzentration in *Lytta vesicatoria*



Man kann daraus ersehen, dass es von Vorteil ist, die Applikation eines radioaktiven Vorläufers direkt nach der Kopulation vorzunehmen und damit die Verdünnung durch körpereigenes, inaktives Cantharidin möglichst niedrig zu halten. Ferner sind im Prinzip Mehrfachapplikationen während der Synthesephase durchführbar; falls es zu Kopulationen kommt, können einerseits die männlichen Tiere nochmals verwendet werden und andererseits kann das Cantharidin der weiblichen *Lytta* auf Grund seiner biologischen Herkunft für biosynthetisch relevante Abbaureaktionen eingesetzt werden.

2.5. Die biosynthetisch aktive Drüse von *L. vesicatoria*

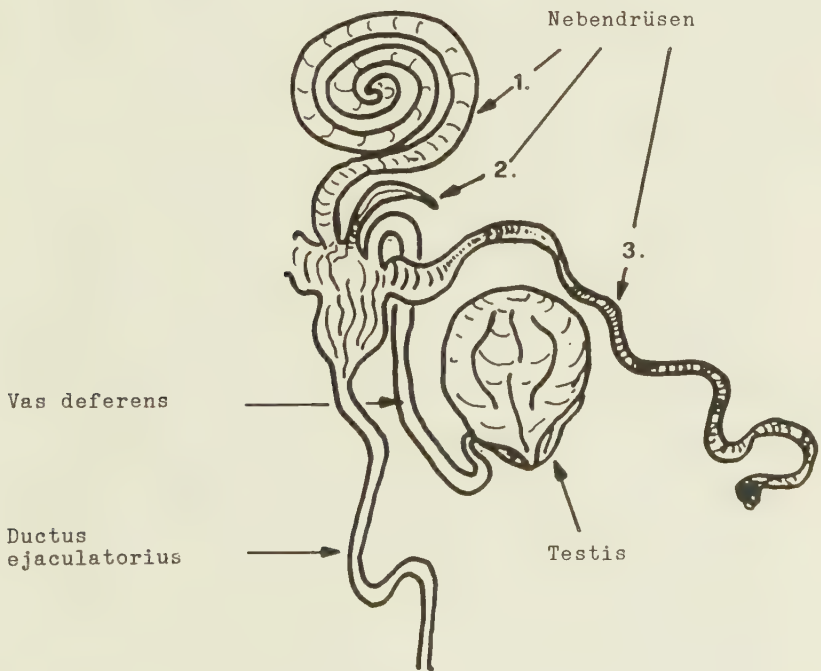
Zahlreiche Untersuchungen ⁵⁹⁾ haben gezeigt, dass die Nebendrüsen (Paragonien) des Genitalapparates adulter männlicher Insekten physiologisch wichtige Verbindungen enthalten, die als sperma Begleitendes Sekret während der Kopulation in die weiblichen Insekten übertragen werden. So wurde z.B. von Chen ⁶⁰⁾ nachgewiesen, dass die Paragonien männlicher *Drosophila funebris* zwei charakteristische Verbindungen PS-1 und PS-2 ⁶¹⁾ produzieren, die die Rezeptivität der weiblichen Insekten senken bzw. die Oviposition stimulieren. Die Struktur von PS-1 konnte aufgeklärt werden, es handelt sich um ein Peptid mit 27 Aminosäuren ⁶²⁾.

Diese Befunde und die Tatsache, dass schon Beauregard ³⁷⁾ eine erhebliche Cantharidin-Konzentration im Genitalbereich männlicher Lytta vesicatoria lokalisieren konnte, veranlassten uns, die Paragonien dieser Insektenspezies bezüglich ihrer Biosyntheseaktivität zu studieren.

Oeffnet man das Abdomen männlicher Lytta vesicatoria ventral mit einem am kaudalen Ende beginnenden longitudinalen Schnitt und entfernt die Chitinhülle sowie wenig Fettgewebe, so ist der Genitalapparat sichtbar, dessen rechte Seite in Abbildung 2 skizziert ist. Der Ductus ejaculatorius ist S-förmig ausgebildet und endet kranial in einer Verbreiterung, in die die Vasa deferentia münden sowie drei paarige Nebendrüsen. Die ersten Nebendrüsen besitzen die Form einer Spirale; die zweiten, sehr viel kleineren Drüsen sind tubenförmig mit distaler Verengung, während die dritten Nebendrüsen lange zylindrische Gebilde mit charakteristischen Verengungen und Schlaufen darstellen. Seziert man männliche Insekten vor der Kopulation, so sind die dritten Nebendrüsen mit einem farblosen, opaken Material gefüllt, anschliessend erscheinen sie leer.

Abbildung 2

Ventrale Ansicht der rechten Hälfte des männlichen
Genitalapparates von Lytta vesicatoria.

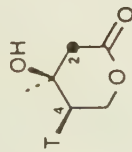


1 mm

Zur Durchführung der in vitro Versuche wurden 27 männliche Lytta vesicatoria ausgewählt, die zwischen 0,5 und 6 Stunden vor Sektionsbeginn kopuliert hatten. Die Insekten wurden mit CO_2 betäubt und anschliessend in kaltem Insekten-Ringer unter sterilen Bedingungen seziiert. Man separierte die drei Nebendrüsen jeweils durch einen Schnitt an der Basis, d.h. der Einmündung in den verbreiterten Ductus ejaculatorius und transferierte sie in ein steriles Gefäss, dass 0,1 ml Ringer-Lösung und $(3R,4R)\text{-4-}^3\text{H}\text{-2-}^{14}\text{C}\text{-13}$ enthielt. Die Inkubation erfolgte bei 25° und wurde jeweils nach 4-5 Stunden abgebrochen, als man feststellte, dass Gewebekontraktionen aufgehört hatten. Danach wurden die entsprechenden Inkubationsansätze zusammengefasst und nach Zusatz von inaktivem Material das Cantharidin durch das übliche saure Aufschlussverfahren ⁵⁵⁾ isoliert. Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefasst; sie beweisen, dass nur die 3. Nebendrüsen der männlichen Lytta vesicatoria Cantharidin biosynthetisieren.

Tabelle 6**

In vitro Experimente mit den Nebendrüsen männlicher Lytta vesicatoria.



(3R,4R)-4-(³H)-
2-(¹⁴C)-13

Nebendrüsen

Nr. Anzahl

spez. Akt. (dpm/mmol)

³H

¹⁴C

³H/¹⁴C

1 51

2 34

3 41

1,02x10¹⁰

9,60x10⁹

1,06

³H

¹⁴C

³H/¹⁴C

180

280

0

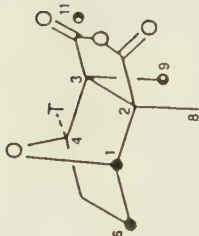
80

2,68x10⁶

1,19x10⁷

0,23

** Die Lokalisierung der ³H-Aktivität in (³H, ¹⁴C)-1a wurde nicht durch Abbau dieser Verbindung bestimmt sondern folgt aus den in 2.7 beschriebenen Experimenten.



(³H, ¹⁴C)-1a

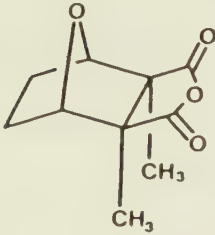
spez. Akt. (dpm/mmol)

2.6. Intraspezifische Wechselwirkungen

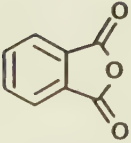
Die Frage, ob Cantharidin ein Pheromon ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Auf Grund der larvalen Phoresie findet die Entwicklung der Larven von Lytta vesicatoria auf einem relativen grossen Areal statt, so dass es denkbar ist, dass ein Aggregationspheromon zur Schwarmbildung der adulten Insekten notwendig ist. Cantharidin wäre für diese Funktion wegen seines hohen Dampfdruckes und der nachgewiesenen, weitreichenden Lockwirkung auf andere Insektenarten ³⁸⁾ geeignet. Da wir keine Feldversuche durchführen konnten, mussten wir uns auf Laborexperimente beschränken und haben in Zusammenarbeit mit Dr. E. Städler (Eidgen. Forschungsanstalt, Wädenswil) Elektroantennogramme von Lytta vesicatoria aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde ein Luftstrom über ein mit 0,01 mg Cantharidin imprägniertes Filterpapier geleitet und anschliessend den Antennen von fixierten männlichen und weiblichen Lytta vesicatoria zugeführt. Männliche und weibliche Antennen reagierten auf Cantharidin mit einer signifikanten Spannungsänderung von 2,0 mV. Dagegen zeigten unter vergleichbaren Versuchsbedingungen Verbindungen mit ähnlichem Dampfdruck wie Phthalsäureanhydrid (16), p-Methoxyzimtsäuremethylester (17), Geraniol (18) und Farnesol (14) keine Reaktion der Antennen, s. Abbildung 3.

Abbildung 3

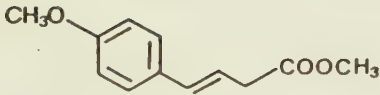
Antennogramme männlicher und weiblicher Lytta vesicatoria



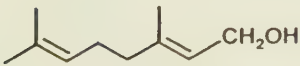
1



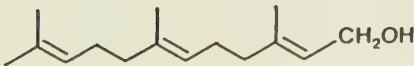
16



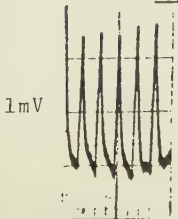
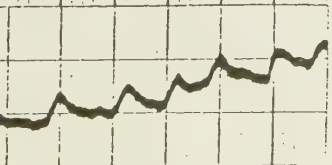
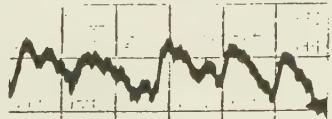
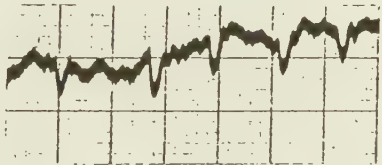
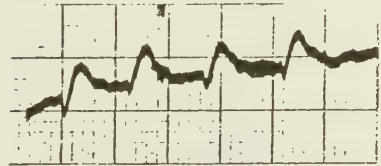
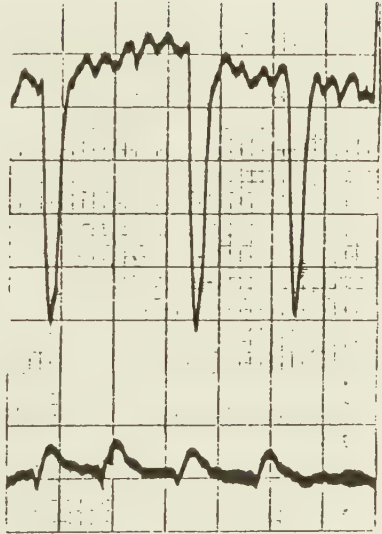
17



18



14



Luft

Eine Bedeutung des Cantharidins für die Schwarmbildung von Lytta vesicatoria ist demnach sehr wahrscheinlich.

Die Empfindlichkeit der Antennen beider Geschlechter bezüglich Cantharidin kann weiterhin als Hinweis auf einen Einfluss des Cantharidins auf das Sexualverhalten von Lytta vesicatoria gedeutet werden.

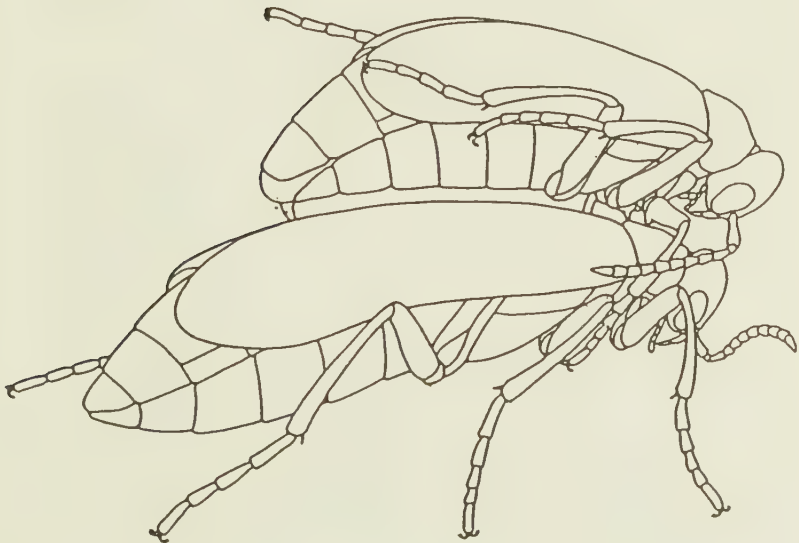
Wir beobachteten ⁶³⁾, dass in der bis zu 30 Minuten dauernden Vorphase zur Kopulation die dorsal aufsitzenden, männlichen Lytta, s. Abb. 4, während sie das Weibchen mit den Vorderbeinen festhalten, in stereotyper Weise mit ihren Antennen und dem Kopf die Antennen und den Kopf des weiblichen Partners schlagen. Dieser Vorgang könnte einen Ueberzeugungsversuch zur Kopulation darstellen, wenn man das für die männlichen Insekten typische Putzverhalten der Antennen berücksichtigt. Dabei wird die Antenne mit einem Vorderbein in den Mund geführt und von der Basis her durch den Mund gezogen. Die Antennen könnten so aus zwei Quellen mit Cantharidin versorgt und mit Hilfe des Speichels benetzt werden: 1.) aus der hämolymphehaltigen Antennenampulle und 2.) durch die Hämolymphe, die zwischen Tibia und Femur austritt, s. Seite 13.

Wie bereits erwähnt, kopulieren die weiblichen Lytta nur einmal und legen nach 10-12 Tagen die befruchteten Eier ab. Es ist durchaus denkbar, dass das übertragene Cantharidin dieses Verhalten induziert, d.h. sowohl die Rezeptivität

als auch die Fekundität der weiblichen Lytta steuert. Andererseits ist nicht auszuschliessen, dass die ersten oder zweiten Nebendrüsen des männlichen Genitalapparates, deren Funktion bisher unbekannt ist, ähnliche Substanzen produzieren, wie sie von Chen ⁶⁰⁾ aus Drosophila funebris isoliert wurden.

Abbildung 4

Lytta vesicatoria vor der Kopulation



2.7. Nachweis der spezifischen Inkorporation von

2-(³H, ¹⁴C)-Mevalonat (2-(³H, ¹⁴C)-13)

Die etablierten Abbaumethoden für Cantharidin, die Kuhn-Roth-Reaktion ⁵¹⁾, der Schmidt-Abbau ⁵¹⁾ sowie der Abbau mit Hilfe einer Diels-Alder/Retro-Diels-Alder-Sequenz ⁶⁴⁾ besitzen zwar den Vorteil, bis herab zu 0,1 mmol Cantharidin anwendbar zu sein, erlauben aber keine Differenzierung enantiotoper C-Atome von 1. Für den Nachweis einer spezifischen Inkorporation von 2-(³H, ¹⁴C)-Mevalonat (2-(³H, ¹⁴C)-13) ist diese Unterscheidung aber erforderlich. Es war zu dem Zweck notwendig, eine Methode auszuarbeiten, die über ein chirales Derivat des Cantharidins führt. Als solches bestens geeignet erwies sich die seit langem bekannte (1)-Cantharsäure ⁶⁵⁾ ((1)-19), deren Racematspaltung mit Brucin erstmals Dankwortt ⁶⁶⁾ gelang. Bei der Ausführung der in den Schemata 7 und 8 dargestellten Abbaureaktionen kamen uns zwei günstige Umstände zu Hilfe: so waren im Arbeitskreis von Prof. Schmid die absolute Konfiguration der (+)-Cantharsäure ((+)-19) mit Hilfe der Horeau-Methode bestimmt worden ⁶⁷⁾ und erste Vorversuche für einen ähnlichen Abbau ausgeführt worden ⁶⁸⁾, die eindeutig gezeigt hatten, dass (+)-19 Schlüsselverbindung eines solchen Projektes ist.

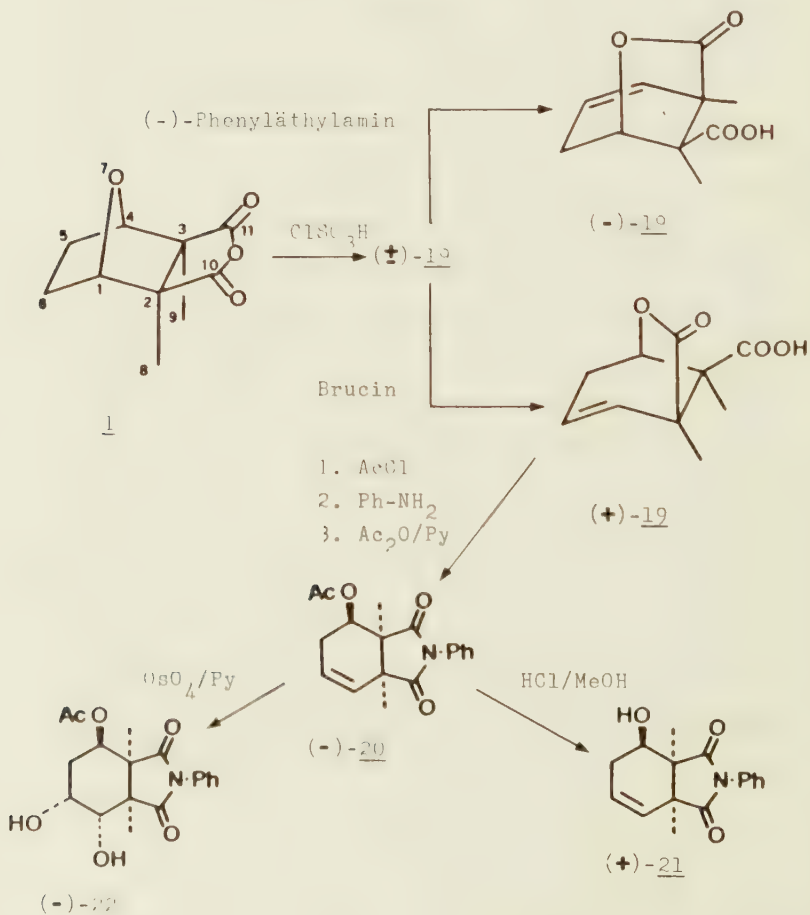
In Uebereinstimmung mit den Literaturangaben ⁶⁶⁾ erhielt man durch Einwirkung von Chlorsulfonsäure auf Cantharidin (1) bei 0° in 70%iger Ausbeute die kristalline (+)-Cantharsäure ((+)-19), deren Spaltung in die Antipoden durch sechsmalige Kristallisation des Brucinsalzes gelang. Die so erhaltene reine (+)-Cantharsäure ((+)-19) besass den literatur-bekannten Drehwert von $[\alpha]_D^{22^\circ} = +91,1^\circ$ ⁶⁶⁾ und zeigte im ¹H-NMR bei Zugabe von Eu(hfc)₃ keine Verunreinigungen mit dem (-)-Antipoden (-)-19 ⁶⁹⁾.

Versuche zur Racematenspaltung mit anderen optisch aktiven Basen wie (-)-Ephedrin, (+)-Amphetamin, (+)-Phenyläthylamin und (5S,4S)-(+)-5-Amino-2,2-dimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan ergaben in verschiedenen Lösungsmitteln keine gut kristallisierenden diastereoisomeren Salze, einzig die Salze mit (-)-Cinchonidin liessen sich kristallisieren, enthielten aber ebenfalls im schwerer löslichen Diastereoisomeren die (+)-Cantharsäure ((+)-19).

Die Darstellung der reinen (-)-Cantharsäure ((-)-19) gelang erstmals durch Racematenspaltung mit (-)-Phenyläthylamin, wobei im Alkohol-Aether-Gemisch das Phenyläthylammoniumsalz der (-)-Cantharsäure die schwerer lösliche Komponente darstellt. Nach mehrfacher Kristallisation des Salzes und Zerlegung erhielt man (-)-Cantharsäure ((-)-19) mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{22^\circ} = -90,2^\circ$. Da hierbei

aber die Ausbeuten an (-)-Cantharsäure ((-)-19) auf Grund der guten Löslichkeit des Phenyläthylammonium-Salzes wesentlich schlechter waren als die Ausbeuten an (+)-Cantharsäure bei der Racematspaltung mit Brucin, wurden die folgenden Abbaureaktionen mit (+)-Cantharsäure ausgeführt

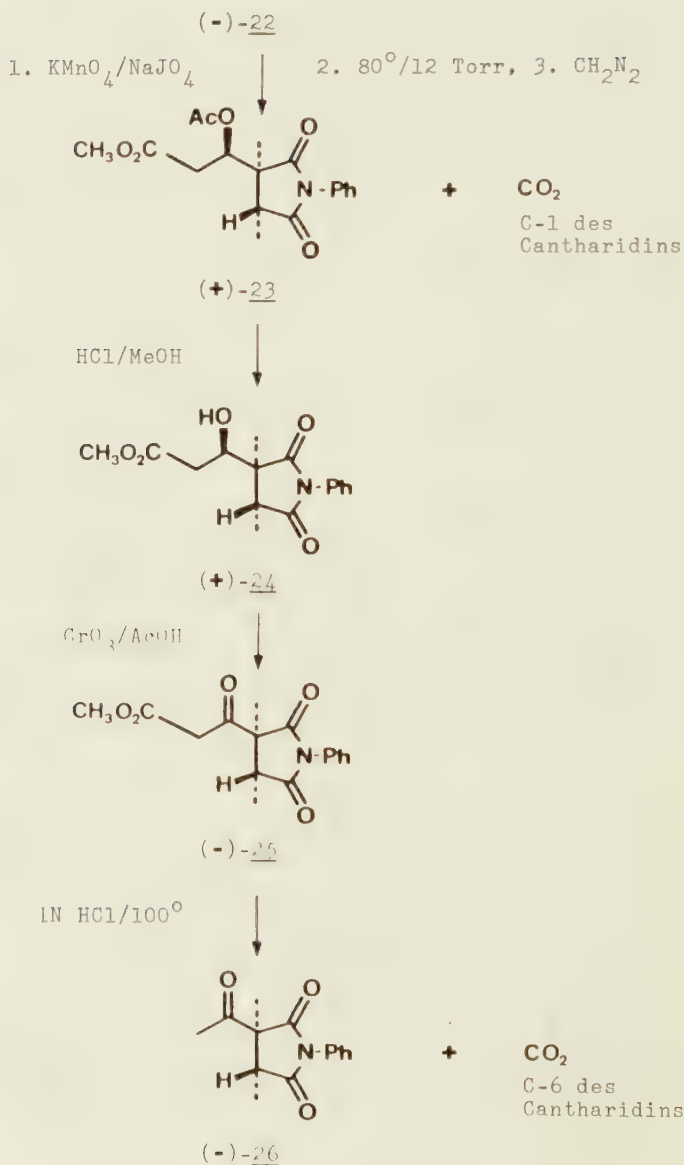
Schema 7



(+)-19 wurde gemäss Schema 7 durch sukzessive Behandlung mit Acetylchlorid und Anilin sowie anschliessende Nachacetylierung mit Acetylchlorid/Pyridin in das (-)-Acetoxyolefin 20 in einer Ausbeute von 95% übergeführt. Die Struktur von 20 ist sowohl durch die spektralen Daten als auch durch seine Ueberführung in das Hydroxyolefin 21 bekannter absoluter Konfiguration eindeutig bestimmt ⁶⁷⁾. Nach einigen erfolglosen Spaltungsversuchen mit Kaliumpermanganat/Natriumperjodat ⁷⁰⁾ sowie Rutheniumtetroxid ⁷¹⁾ gelang die Funktionalisierung der Doppelbindung von 20 mit Hilfe von Osmiumtetroxid in abs. Pyridin ⁷²⁾. Das in nahezu quantitativer Ausbeute gebildete Acetoxydiol 22 besitzt sehr wahrscheinlich die in Schema 7 gezeigte Konfiguration, die einem Angriff des Osmiumtetroxids an 20 von der sterisch günstigeren Seite entspricht. Die Oeffnung des Acetoxydiols 22 wurde mittels Kaliumpermanganat/Natriumperjodat durchgeführt und das gebildete Carbonsäuregemisch 5 Minuten auf 80°/12 Torr erhitzt, um die Decarboxylierung zu vervollständigen. Man veresterte die entstandene Monocarbonsäure mit Diazomethan und erhielt den optisch aktiven (+)-Acetoxyester 23 in einer Gesamtausbeute von 30%, s. Schema 8.

Auf diese Weise gewinnt man C-1 des Cantharidins (1) als CO₂. Umsetzung von (+)-23 mit 5N methanolischer Salzsäure lieferte in 85% Ausbeute den

Schema 8



(+)-Hydroxyester 24, dessen Reaktion mit CrO_3 in Eisessig/Wasser in 40% Ausbeute den (-)-Ketoester 25 ergab, welcher nach den Spektraldaten ein Gemisch der Keto-/Enol-Form im Verhältnis 7:3 darstellte und wahrscheinlich deswegen nicht kristallisierbar war. Die säurekatalysierte Decarboxylierung von 25 führte in 70% Ausbeute zum kristallinen Endprodukt dieses Abbaus, dem Ketoimid 26. Das entstandene CO_2 , C-6 des Cantharidins, wurde mit gleicher Ausbeute als BaCO_3 abgefangen, s. Schema 8.

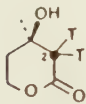
Zur Anwendung des voranbeschriebenen Abbaus wurde einer grossen Anzahl männlicher Lytta vesicatoria 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat (2-(^3H , ^{14}C)-13*) injiziert und nach mehreren Tagen Ueberlebenszeit das radioaktive Cantharidin isoliert.

Das erste bemerkenswerte Resultat dieser Experimente ist die Tatsache, dass das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis des Vorläufers bei der Bildung des Cantharidins auf 50% absinkt, s. Tabellen 7, 8 und 9. Das bedeutet, dass im isolierten Allomon das Verhältnis der markierten Atome $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 1:1$ ist.

Der Kuhn-Roth - Abbau eines dieser Cantharidinpräparate, s. Tabelle 7, ergab Essigsäure mit 17,5% der molaren ^{14}C -Aktivität und 29,0% der molaren ^3H -Aktivität von (^3H , ^{14}C)-1, sowie gleichem $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Verhältnis wie beim applizierten Vorläufer. Dieser Befund bestätigt

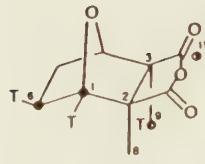
Tabelle 7

Kuhn-Roth-Abbau eines Cantharidinpräparates, isoliert nach Injektion von 2-(^3H , ^{14}C)-13*, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 5,69, in 100 männliche Lytta vesicatoria.



2-(^3H , ^{14}C)-13*

↓



Spezifische Aktivität (dpm/mmol)

^3H	%	^{14}C	%	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
$2,78 \times 10^6$	100	$8,48 \times 10^5$	100	3,28

(^3H , ^{14}C) - 1

↓



$4,02 \times 10^5$	29,0	$7,40 \times 10^4$	17,5	5,43
--------------------	------	--------------------	------	------

C-(2+3+8+9)

die sesquiterpenoide Biogenese von 1, zeigt aber, unter Berücksichtigung der Randomisierung der terminalen Methylgruppen des Biosynthesezwischenproduktes, dass nur 3 von 4 möglichen Positionen des Cantharidins ^3H -markiert sind.

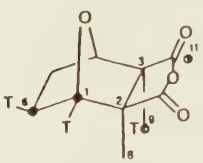
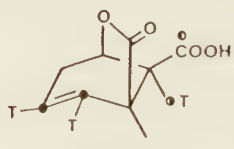
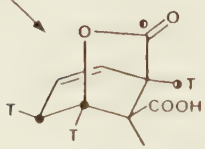
Bei der Ueberführung von $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{1}^*$ in die $(+)$ -Cantharsäure, s. Tabelle 8, stellte man einen Verlust von 5% der molaren ^3H -Aktivität fest, was zunächst so aussah, als hätte man es mit einer nicht signifikanten, innerhalb der Fehlergrenze liegenden Abweichung von der molaren Aktivität der Ausgangsverbindung $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{1}^*$ zu tun. Nach der Racematspaltung mit Brucin, die in 67% die reine $(+)$ -Cantharsäure $(+)\text{-}\underline{19}$ lieferte, wurde aber für ^3H ein Verlust von 24,8%, s. Tabelle 8, bzw. 20,2%, s. Tabelle 9, bezüglich der molaren Aktivität des Cantharidins gemessen, wohingegen die molaren ^{14}C -Aktivitäten von $(+)\text{-}\underline{19}$ und $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{1}^*$ identisch waren.

Die durch die Racematspaltung mit $(-)$ -Phenyläthylamin gewonnene reine $(-)$ -Cantharsäure $(-)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{19}$, s. Tabelle 8, zeigte einen entgegengesetzten Trend: hier wurde relativ zum Cantharidin ein "Ueberschuss" an molarer ^3H -Aktivität von 13% bestimmt.

Da die Zählresultate der $(+)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-Cantharsäuren}$ $(+)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{19}$ aus verschiedenen Experimenten mit $2\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-Mevalonat}$ ($2\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{13}$) reproduzierbar waren und zudem bei einem Kontrollversuch mit Deuterio-chlorsulfonsäure/ D_2O aus Cantharidin nicht-deuterierte

Tabelle 8

Darstellung der Cantharsäuren aus einem Cantharidin-
präparat, isoliert nach Injektion von 2-(^3H , ^{14}C)-13,
 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 4,75, in 122 männliche Lytta vesicatoria.

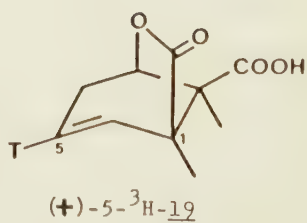
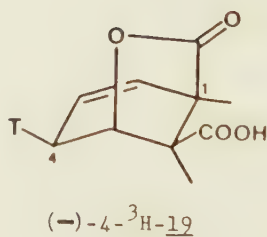
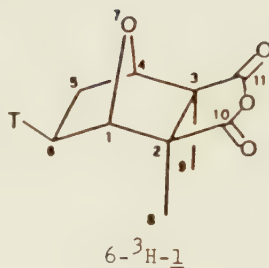
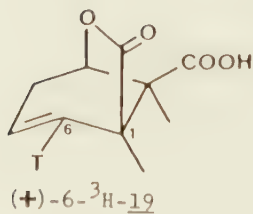
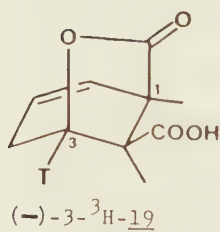
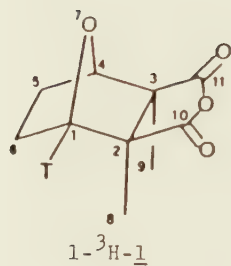
	Spezifische Aktivität (dpm/mmol)				
	^3H	%	^{14}C	%	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
	$3,35 \times 10^6$	100	$1,58 \times 10^6$	100	2,12
$(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{13}^*$ 					
$(+)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{19}$	$3,20 \times 10^6$	95,5	$1,58 \times 10^6$	100	2,03
	$2,52 \times 10^6$	75,2	$1,54 \times 10^6$	97,5	1,64
$(+)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{19}$ 					
$(-)\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})\text{-}\underline{19}$	$3,77 \times 10^6$	113	$1,61 \times 10^6$	102	2,34
					

(+)-Cantharsäure entstand ⁵⁷⁾, was darauf hinweist, dass unter den Reaktionsbedingungen keine Protonen mit der Umgebung ausgetauscht werden, sind die Differenzen der molaren ³H-Aktivitäten der (+)- bzw. (-)-Cantharsäuren in Bezug auf Cantharidin eindeutig ausserhalb der Fehlergrenze und damit als signifikant anzusehen.

Auf Grund der Grössenordnung dieser Abweichungen lässt sich dieser Befund zufriedenstellend mit dem Auftreten intramolekularer, sekundärer Isotopieeffekte infolge Umhybridisierung ($sp^3 \rightarrow sp^2$) der an der Reaktion beteiligten isotop-markierten Kohlenstoffatome 1 und 6 des Cantharidins erklären. Dabei ist zu berücksichtigen, dass man es mit einer sehr kleinen Konzentration einfach ³H-markierter Moleküle 1-³H-1 und 6-³H-1 zu tun hat.

Im Schema 9 wird die bevorzugte Bildung von (-)-3-³H-19 und (-)-4-³H-19 veranschaulicht. Die Formulierung der exo-Position für das ³H an C-6 von 6-³H-1 beruht auf der Annahme, dass die Isomerisierung des Cantharidins aus stereoelektronischen Gründen mit einer Präferenz für das endo-ständige Wasserstoffatom verläuft. Wäre die ³H-Markierung an C-6 in der endo-Position, würde man wegen eines primären Isotopieeffektes eine (-)-(³H)-Cantharsäure mit wesentlich höherer spezifischer Aktivität erwarten. Der Verlust von 5% der molaren ³H-Aktivität bei der Bildung der racemischen Cantharsäure (+)-(³H, ¹⁴C)-19 aus (³H, ¹⁴C)-1 wird bestätigt durch einen Verlust von

Schema 9

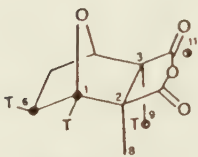
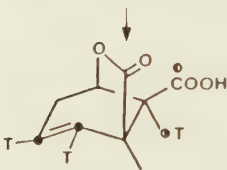
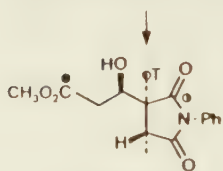
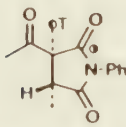


7% bzw. 12% der ^3H -Aktivität, der bei (+)-(^3H , ^{14}C)-19 auftritt, s. Tabellen 8 und 9. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Effekt, der durch den nicht-synchronen Anteil der Umwandlung von 6- ^3H -1 in (+)-19 entsteht.

Aus der (+)-(^3H , ^{14}C)-Cantharsäure ((+)-(^3H , ^{14}C)-19*) wurde anschliessend in 83,5% Ausbeute das Acetoxyolefin (^3H , ^{14}C)-20 erhalten, dessen spezifische ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten identisch waren mit denen des Ausgangsmaterials. Die Fortsetzung des Abbaus gemäss Schemata 7 und 8 ergab in einer Gesamtausbeute von 31,3% den Acetoxyester (^3H , ^{14}C)-23 als Oel, der nach Umesterung (54,5%) zum kristallinen Hydroxyester (^3H , ^{14}C)-24 führte. Von diesem erhielt man eine Präparat konstanter spezifischer Aktivität, dessen molare ^3H -Aktivität innerhalb der Fehlergrenze mit derjenigen der Essigsäure des Kuhn-Roth-Abbaus von (^3H , ^{14}C)-1, s. Tabelle 7, übereinstimmte und dessen molare ^{14}C -Aktivität als Differenz die Bestimmung der spezifischen Aktivität von C-1 des Cantharidins (^3H , ^{14}C)-1 ermöglicht. Oxydation des Hydroxyesters (^3H , ^{14}C)-24 und anschliessende Hydrolyse des gebildeten Ketoesters (^3H , ^{14}C)-25 lieferte eine Ketosäure, die unter den Reaktionsbedingungen spontan decarboxylierte, wobei sich das Endprodukt dieses Abbaus, das kristalline Ketoimid (^3H , ^{14}C)-26 in 73,6% Ausbeute bildete. Das entstandene CO_2 , C-6 von (^3H , ^{14}C)-1 $\S$ * wurde

Tabelle 9

Abbau eines Cantharidinpräparates, isoliert nach
Injektion von 2-(^3H , ^{14}C)-13* $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 3,17, in
158 männliche Lytta vesicatoria.

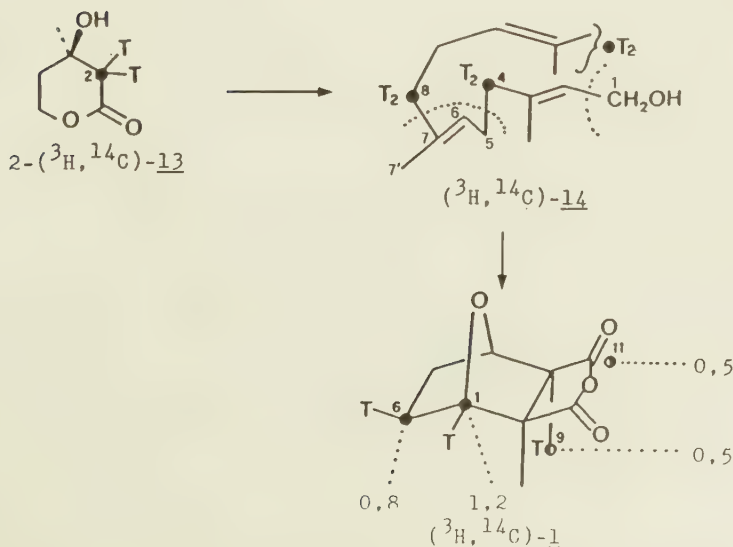
	Spezifische Aktivität (dpm/mmol)				
	^3H	%	^{14}C	%	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
 $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ - <u>13</u> **	$9,95 \times 10^5$	100	$6,60 \times 10^5$	100	1,51
 $(+)$ - $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ - <u>19</u> *	$7,95 \times 10^5$	79,8	$6,60 \times 10^5$	100	1,20
 $(+)$ - $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ - <u>21</u>	$2,76 \times 10^5$	27,7	$3,87 \times 10^5$	58,6	0,71
 $(-)$ - $(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ - <u>22</u>	$2,97 \times 10^5$	29,8	$2,15 \times 10^5$	32,6	1,38
CO_2	-	-	$1,59 \times 10^5$	24,1	-
C-6 des Cantharidins					

als Bariumcarbonat abgefangen.

Die Resultate dieser Abbaureaktionen lassen sich folgendermassen interpretieren. Das achirale „Monoterpen“ Cantharidin wird aus einer chiralen Faltung des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol unter Abspaltung von C-1, C-5, C-6, C-7 und C-7' gebildet, zum Mechanismus vgl. 2.8.2. Dabei wird offenbar von C-8 des Farnesols ^3H entfernt, denn Cantharidin besitzt an C-6 nur noch „ein“ ^3H , dass sich mit grosser Wahrscheinlichkeit in exo-Position befindet.

Die ^3H - und ^{14}C -Verteilung im Cantharidin deutet ferner daraufhin, dass die drei an der Biosynthese beteiligten Isopreneinheiten mit unterschiedlichen Einbauraten in Cantharidin umgewandelt werden.

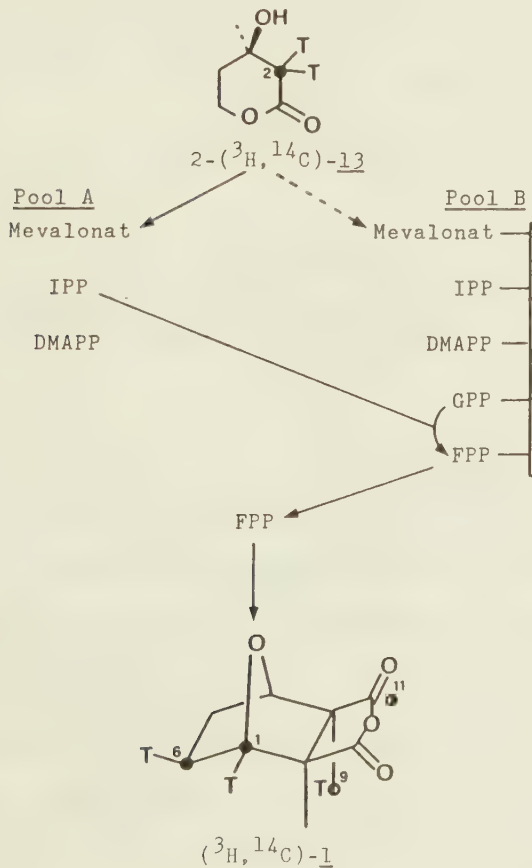
Schema 10



Wir sind der Ansicht, dass dieser Befund mit der Bildung des Farnesols aus Mevalonat zusammenhängt, aber nicht mit der Umwandlung von Farnesol in Cantharidin; denn wie in 2.8.1.2 eindeutig gezeigt wird, bleibt das Verhältnis von zwei ^{14}C -Markierungen in der ersten und letzten Isopreneinheit des Farnesols bei der Inkorporation in Cantharidin in den relevanten C-Atomen erhalten ⁶⁴⁾. Ueber die Ursache derartiger „unregelmässiger“ Markierungen bei der Biosynthese von Terpenen pflanzlicher Herkunft ist verschiedentlich spekuliert worden und ein bevorzugter Einbau von Isopentenylpyrophosphat (IPP) relativ zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) auf eine Pool-Separierung gemäss Schema 11 zurückgeführt worden ⁷⁴⁾. Dabei wird offenbar extern appliziertes, radioaktives Mevalonat bevorzugt in den Pool A eingeschleust, weil der Pool B mit den enzymgebundenen Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese gesättigt ist. Damit wird auch die experimentelle Beobachtung verständlich, dass die Inkorporationsraten für DMAPP und IPP von der Fütterungsdauer abhängig sind ⁷⁵⁾. Verwendet man das Konzept der Pool-Separierung zur Erklärung der irregulären Radioaktivitätsverteilung im Cantharidin, so muss man annehmen, dass der Pool B bis zum Geranylpyrophosphat (GPP) nahezu substratgesättigt ist, so dass der radioaktive Vorläufer Pool A bevorzugt markiert, und damit höhere Einbauraten für die dritte Isopreneinheit von Farnesol resultieren.

Trotz einiger Anomalien ist mit den beschriebenen Ab-
bauversuchen der spezifische Einbau von Mevalonat in Can-
tharidin nachgewiesen und die ungewöhnliche Abspaltung
des mittleren C-4 Fragmentes aus dem Biosynthesezwischen-
produkt Farnesol bestätigt ⁵²⁾.

Schema 11

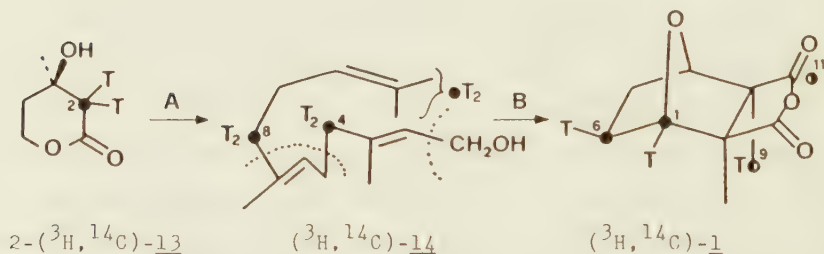


2.8. Umwandlung von Farnesol (14) in Cantharidin (1)

2.8.1. Randomisierung der terminalen Methylgruppen von 14

Einbauversuche mit $2\text{-}(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -Mevalonat hatten wiederholt gezeigt, dass eine Randomisierung dieser Markierung in den beiden C-Atomen des Cantharidins auftritt, welche aus den beiden Methylgruppen von Dimethylallylpyrophosphat stammen, s.Schema 12.

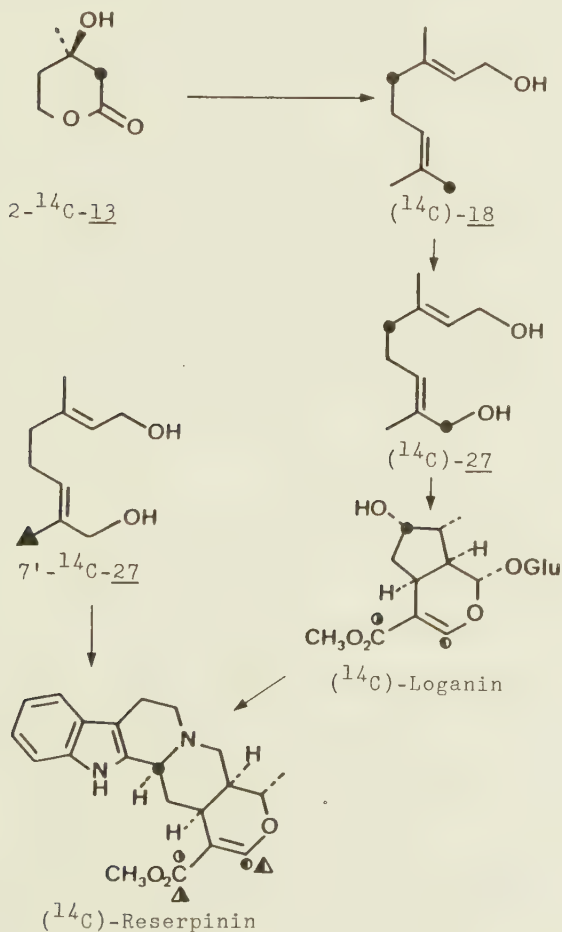
Schema 12



Dieser Sonderfall der Terpenbiosynthese wird u.a. auch bei der Biosynthese von Iridoiden und den sich davon herleitenden monoterpenoiden Molekülfragmenten der Indolalkaloide beobachtet ^{76,77}). In diesem Zusammenhang sind Versuche von Arigoni ⁷⁸) und Battersby ⁷⁹) zu erwähnen, mit denen nachgewiesen wurde, dass diese Randomisierung nach der Bildung des Biosynthesezwischenproduktes 8-Hydroxygeraniol (27) auftritt, s. Schema 13.

Es war demzufolge naheliegend zu prüfen, ob die im Fall des Cantharidins beobachtete Radioaktivitätsverteilung zu je ~50% in C-9 und C-11 von 1 im Verlauf der Biosynthesesequenz B erfolgt, s. Schema 12.

Schema 13



2.8.1.1. Synthese von E,E-11'-(³H,¹⁴C)-Farnesol
(E,E-11'-(³H,¹⁴C)-14)

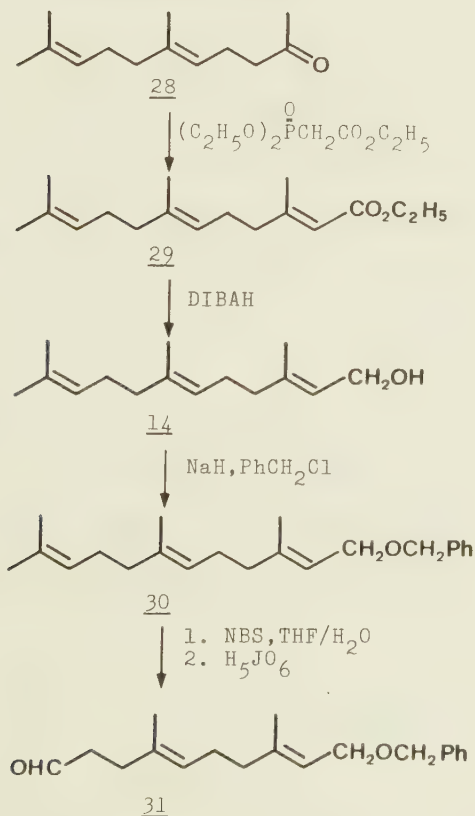
Zum Nachweis einer Randomisierung der terminalen Methylgruppen des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol (14) bei der Umwandlung in 1 war es notwendig, eine der beiden Methylgruppen von 14 radioaktiv zu markieren unter Berücksichtigung des experimentellen Befundes, dass die Insekten selektiv das E,E-Isomere des Farnesols in Cantharidin umwandeln ⁵³⁾ .

Zur Einführung der Markierung hielten wir eine Variation der Wittig-Reaktion nach Buddrus ⁸⁰⁾ für geeignet, s. Schema 15, weil unter den milden Bedingungen der Doppelbindungsbildung eine hohe Stereoselektivität zugunsten des E-Isomeren zu erwarten war, zudem ist Methyljodid sowohl mit ³H als auch mit ¹⁴C in hohen spezifischen Aktivitäten käuflich.

Ausgehend von E-Geranylaceton (28) wurde durch eine Wittig-Horner-Reaktion gemäss Schema 14 in 92% Ausbeute ein Stereoisomerengemisch des Farnesylsäureäthylesters (29) der Zusammensetzung 76% E,E- und 24% Z,E-29 dargestellt. Die Auftrennung in die reinen Stereoisomeren gelang mittels präp.DC und ergab in 65% Ausbeute 99% GC-reinen E,E-Farnesylsäureäthylester (E,E-29). Durch Reduktion mit DIBAH erhielt man in 96% Ausbeute 98,5% GC-reines E,E-Farnesol (14), dessen Alkoholfunktion

zur weiteren Umsetzung in 95% Ausbeute als Benzyläther 30 geschützt wurde. Anschliessend epoxidierte man die terminale Doppelbindung nach van Tamelen ⁸¹⁾ und spaltete das Epoxid mit Perjodsäure ⁸²⁾ unter Bildung des ω -Benzyloxy-aldehyds (31) in einer Gesamtausbeute von 23%.

Schema 14

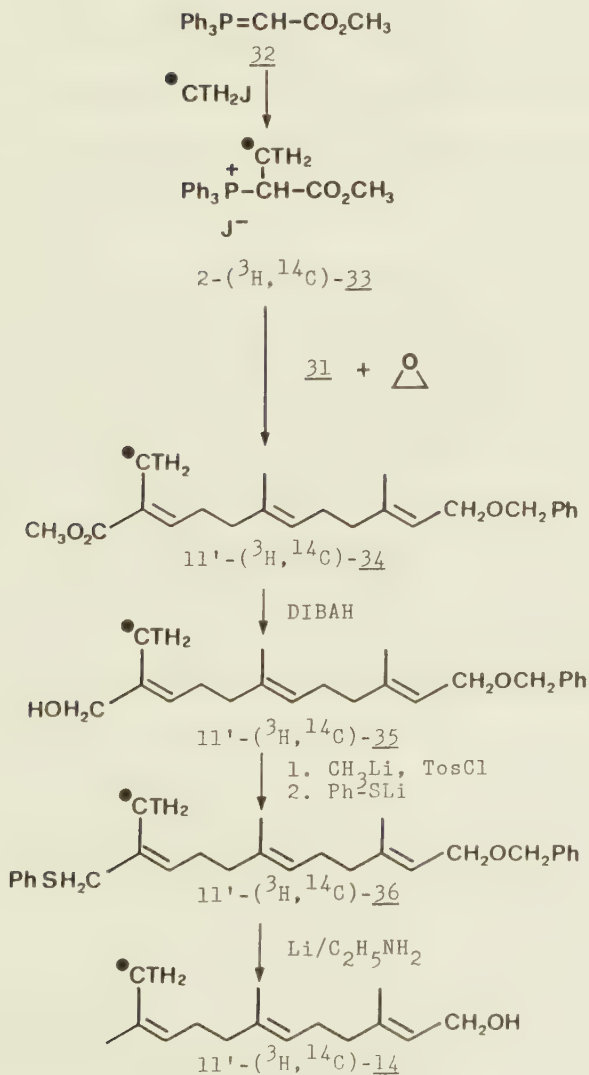


Für die folgende nach Buddrus ⁸⁰⁾ modifizierte Wittig-Reaktion wurde das Phosphoran 32 mit $\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$ und $^{14}\text{CH}_3\text{J}$ in Essigester im Bombenrohr 2 Stunden bei 75° umgesetzt und das kristalline Phosphoniumsalz 2-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-33 in 76% Ausbeute erhalten.

Anschliessend wurde 2-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-33 im Bombenrohr mit einem 5%igen Ueberschuss des Aldehyds 31, gelöst in Benzol, überschichtet und nach Zugabe des gleichen Volumens Oxiran im geschlossenen Rohr 48 Stunden bei 25° stehengelassen. Nach präp. DC erhielt man den reinen Benzyloxyester 11'-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-34 in einer Ausbeute von 85% (nach ^1H -NMR und GC 95% E,E,E-11'-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-34). Durch Reduktion mit DIBAH wurde in 80% der GC- und radio-dünnschichtchromatographisch reine Benzyloxyalkohol 11'-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-35 mit den folgenden spezifischen Aktivitäten erhalten: ^3H : 17,9 mCi/mmol und ^{14}C : 0,84 mCi/mmol, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 21,4.

Zur Ueberführung der Hydroxymethylgruppe von 11'-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-35 in eine Methylgruppe unter gleichzeitiger Abspaltung der Benzylschutzgruppe wurde ein Verfahren nach Storck ⁸³⁾ und Altman ⁸⁴⁾ gewählt, das zunächst die Bildung des Thioäthers 11'-($^3\text{H}, ^{14}\text{C}$)-36 vorsieht, s. Schema 15.

Schema 15



Zu dem Zweck deprotonierte man unter Triphenylmethan-
kontrolle den Alkohol 11'-(^3H , ^{14}C)-35 mit Methyl-
lithium in Aether/HMPT, fügte bei 0° einen 2N Ueber-
schuss an Tosylchlorid hinzu und injizierte nach 2
Stunden Reaktionsdauer einen 9N Ueberschuss an Li-
thiumthiophenolat. Nach 2 Stunden bei 25° arbeitete
man auf und isolierte nach präp. DC in 39% Thioäther
11'-(^3H , ^{14}C)-36.

In der folgenden Stufe musste die Vorschrift nach
Altman⁸⁴⁾ variiert werden, da unter den angegebenen
Bedingungen eines grossen Ueberschusses an Li in Aethyl-
amin (blaue Lösung) bei -78° aus 36 mehrheitlich 2,3-
Dihydrofarnesol entstand. Dessen Bildung konnte verhindert
werden, indem man den Thioäther 11'-(^3H , ^{14}C)-36 in einer
10:1-Mischung von Aethylamin/THF vorlegte, bei -78°
wenige Stücke Lithiumdraht (mit 1% Natrium) hinzufügte
und solange rührte bis eine schwache Blaufärbung auftrat.
Daraufhin wurde mit Methanol gequench und in 80% Aus-
beute 11'-(^3H , ^{14}C)-14 isoliert, das radiodünnschicht-
chromatographisch rein war und gaschromatographisch
neben E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-14 noch 1% des Z,E-Isomeren
sowie 1,5% unidentifizierte Beimengungen enthielt f3).

f3)

Die Stereoisotopomerenreinheit von E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-
14 wurde an Hand einer ähnlich ausgeführten Synthese
mit ^{13}C -markierten Verbindungen überprüft, s. 3.1.

Zur Ueberprüfung der spezifischen Aktivitäten und des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses wurde eine Probe dieses Präparates mit inaktivem, reinem E,E-Farnesol (E,E-14) verdünnt und in das kristalline 3,5-Dinitrobenzoat übergeführt.

Nach Reinigung mittels präp. DC und mehrfacher Kristallisation in Pentan erhielt man ein Präparat konstanter spezifischer Aktivität mit den folgenden Daten, $^3\text{H} = 17,5$ mCi/mmol, $^{14}\text{C} = 0,83$ mCi/mmol, $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 21,1$.

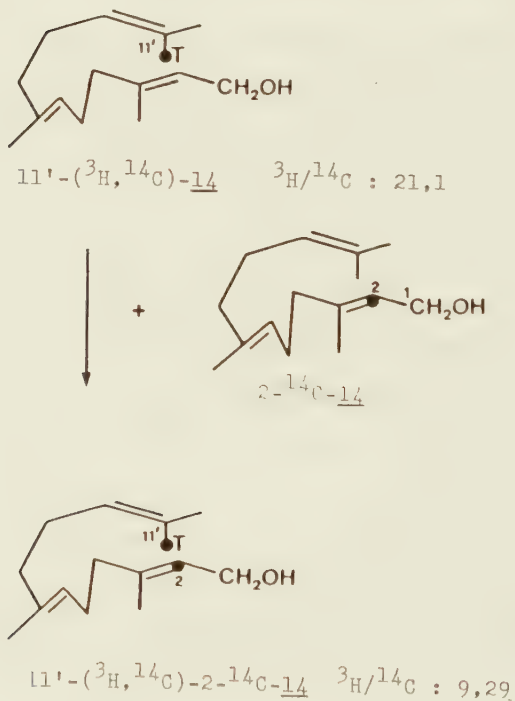
Ein Teil dieses synthetischen Farnesols E,E-11'-($^3\text{H},^{14}\text{C}$)-14 wurde mit synthetischem E,E-2- ^{14}C -Farnesol (E,E-2- ^{14}C -14) ^{f4)} der spezifischen Aktivität 0,99 mCi/mmol gemischt und so eine dreifach markierte Probe E,E-11'-($^3\text{H},^{14}\text{C}$)-2- ^{14}C -14 erhalten, die ebenfalls zur Bestimmung eines genauen $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses sowie der spezifischen Aktivitäten in das 3,5-Dinitrobenzoat übergeführt und bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt wurde. Man erhielt in Uebereinstimmung mit dem Mischungsverhältnis der beiden radioaktiven Proben ein $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis von 9,29.

f4)

Die Synthese von E,E-2- ^{14}C -14 wurde gemäss der in Schema 14 dargestellten Wittig-Horner-Reaktion ausgeführt.

Daraus lässt sich berechnen, dass die Verteilung der beiden ^{14}C -Markierungen im Farnesol E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -14, s. Schema 16, der folgenden Relation entspricht: ^{14}C -2/ ^{14}C -11' = 56/44.

Schema 16



2.8.1.2. Einbauversuche mit E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-14 und
E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -14

Die in 2.8.1.1 beschriebenen Farnesolpräparate E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-14 und E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -14 wurden entsprechend den in 2.4 beschriebenen Versuchsbedingungen 25 bzw. 29 männlichen Lytta vesicatoria injiziert und die Insekten nach jeweils vier Tagen Ueberlebenszeit ohne Zugabe von inaktivem Cantharidin aufgearbeitet ⁶⁴⁾. Damit konnte erstmals eine Einbaurate von 0,6% für einen Biosynthesevorläufer des Cantharidins bestimmt werden ^{f5)}.

Anschliessend verdünnte man die Cantharidinproben mit einer genügenden Menge inaktiven Cantharidins, um Kuhn-Roth- und Schmidt-Abbaureaktionen durchführen zu können. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

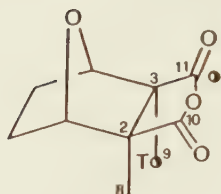
Als erstes fällt auf, dass beide applizierten Vorläufer Cantharidin-Präparate mit einem $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis erzeugen, das einer ^3H -Retention von 48% während der biosynthetischen Umwandlung 14 in 1 entspricht.

f5)

Frühere Angaben der Einbauraten ⁵⁵⁾ bezogen sich jeweils auf die aus männlichen Lytta vesicatoria extrahierbare Radioaktivität und sind damit abhängig von der Ueberlebenszeit der Insekten.

Tabelle 10

Abbau eines Cantharidinpräparates, isoliert nach
Injektion von 11'-(^3H , ^{14}C)-14, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 21,1, in
25 männliche Lytta vesicatoria.

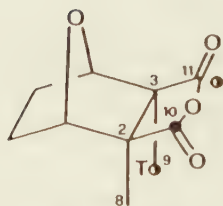


Spezifische Aktivität (dpm/mmol)				
^3H	%	^{14}C	%	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
$2,27 \times 10^7$	100	$2,26 \times 10^6$	100	10,0

(^3H , ^{14}C)-1b

$^{\bullet}\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ C-(2+3+8+9)	$1,09 \times 10^6$	96,2	$5,46 \times 10^5$	48,3	20,0
$^{\bullet}\text{CO}_2$ C-(10+11)	-	-	$4,92 \times 10^5$	43,5	-

Abbau eines Cantharidinpräparates, isoliert nach
Injektion von 11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -14, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 9,29
in 29 männliche Lytta vesicatoria.



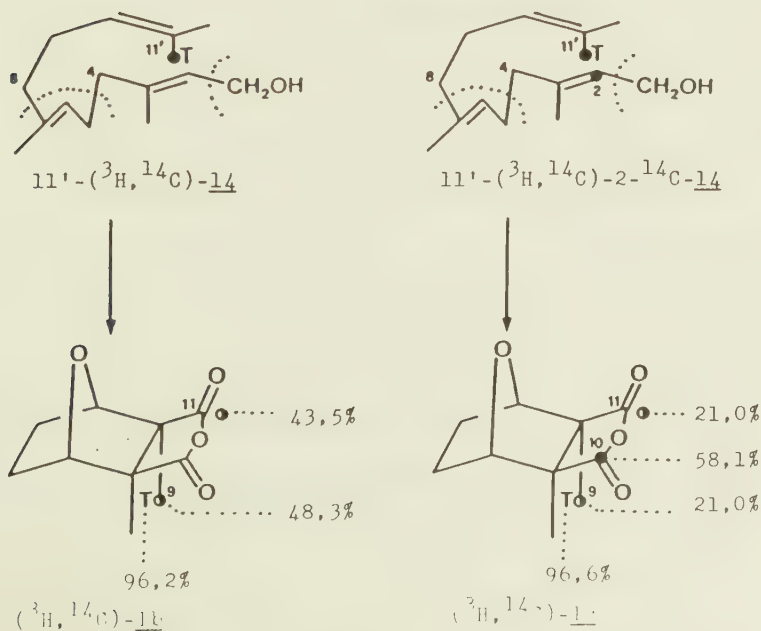
Spezifische Aktivität (dpm/mmol)				
^3H	%	^{14}C	%	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
$1,20 \times 10^7$	100	$2,69 \times 10^6$	100	4,47

(^3H , ^{14}C)-1c

$^{\bullet}\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ C-(2+3+8+9)	$5,79 \times 10^6$	96,6	$2,82 \times 10^5$	21,0	20,6
$^{\bullet\bullet}\text{CO}_2$ C-(10+11)	-	-	$1,06 \times 10^6$	79,1	-

Die Abbauresultate, s. Tabelle 10, bestätigen diesen Hinweis auf eine Randomisierung. Die gesamte molare ^3H -Aktivität des Cantharidins sowie die Hälfte der ^{14}C -Aktivität wird im Versuch mit E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-14 in der Kuhn-Roth-Essigsäure gefunden, während die andere Hälfte im Bariumcarbonat des Schmidt-Abbaus nachweisbar ist. Die Abbauprodukte des aus E,E-11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -14 produzierten Cantharidins dokumentieren ein weiteres wichtiges Detail dieser Biosynthese. Das Verhältnis der ^{14}C -Markierung an C-2 und C-11' im Vorläufer Farnesol bleibt bei der biosynthetischen Umwandlung in den korrespondierenden Atomen des Cantharidins C-10 und C-9 + C-11 erhalten, s. Schema 17.

Schema 17



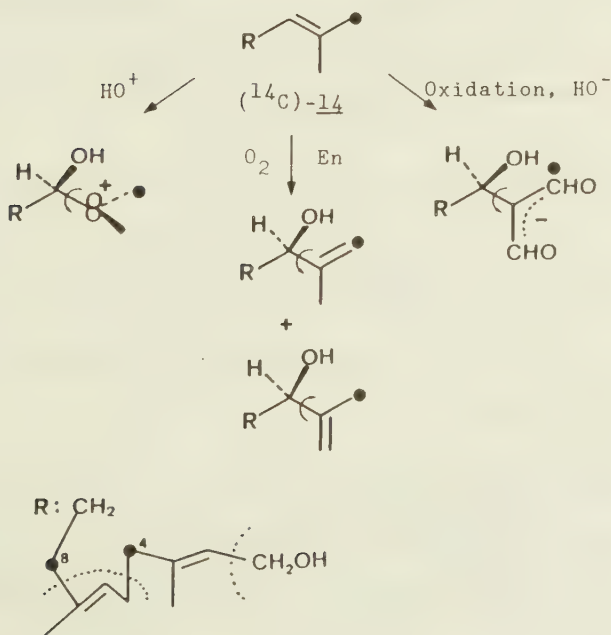
Damit ist ein eindeutiger Hinweis für eine intramolekulare, enzym-gebundene Cyclisierung des Farnesols gegeben und die irreguläre Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Cantharidin nach Applikation von 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat (2-(^3H , ^{14}C)-13) auf unterschiedliche Einbauraten von Geranylpyrophosphat und die dritte Isopreneinheit (Pool-Separierung) zurückgeführt, s. 2.7.

Die Ursache der hier nachgewiesenen Randomisierung ist schwer zu eruieren. Wahrscheinlich erfolgt die Verteilung der Radioaktivität in einer offenkettigen Cantharidin-vorstufe, bei der die Diastereotopie der beiden terminalen Methylgruppen des Farnesols aufgehoben ist. Das wäre z.B. möglich in einem frei drehbaren Carbeniumion, das nach elektrophiler Addition von möglicherweise OH^+ an die terminale Doppelbindung entsteht oder in Analogie zur Hypothese für die Aequilibrierung im Verlauf der Iridoidbiosynthese auf einer Dialdehydvorstufe, s. Schema 18^{85,86}). Obwohl auf Grund der in diesem Fall zu erwartenden Isotopieeffekte mit den vorhandenen experimentellen Daten diese beiden Fälle nicht zu unterscheiden sind, erscheint die letztere Variante doch recht "umständlich", da anschliessend das endo-C-Atom wieder reduziert werden muss. Eine andere Möglichkeit besteht im Prinzip in einer unspezifischen En-Reaktion, s. Schema 18. Dagegen ist einerseits einzuwenden, dass in der Literatur keine Hinweise existieren, dass die für derartige

Oxidationen verantwortlichen Cytochrom-Oxidase-artige Reaktionen zeigen ⁸⁷⁾.

Andererseits ist auch nicht glaubhaft ⁸⁸⁾ nachgewiesen worden, dass Cytochrom P450-Oxidase, die z.B. die Umwandlung von Geraniol (18) in Hydroxygeraniol 27 katalysieren ⁸⁹⁾, s. Schema 13, unter Retention einer spezifischen Markierung operieren.

Schema 18



2.3.2. Ein Vorschlag zum Mechanismus der Umwandlung von Farnesol (14) in Cantharidin (1)

Der Mechanismus der biosynthetischen Farnesol - Fragmentierung bleibt auf Grund fehlender isolierbarer Zwischenprodukte zunächst spekulativ. Die im Schema 19 formulierte Möglichkeit bezieht die folgenden aus unseren Experimenten hergeleiteten Argumente ein:

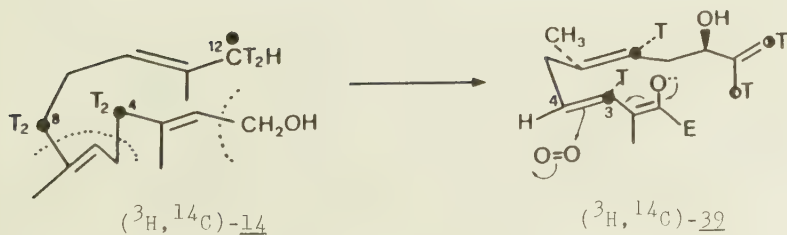
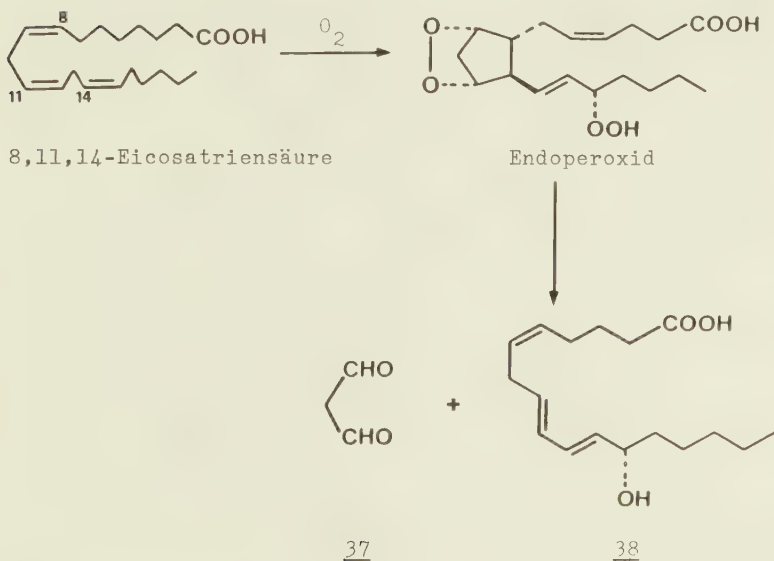
- 1.) der Einbau von 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat (2-(^3H , ^{14}C)-13) führt im Cantharidin (^3H , ^{14}C)-1 zu nur „einer“ ^3H -Markierung in exo-Position an C-6,
- 2.) die Molekülfragmente C-(2-4) und C-(8-12) des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol werden mit gleichen Einbauraten in Cantharidin umgewandelt, wobei die terminalen Methylgruppen (C-11' und C-12) von 14 randomisiert werden und
- 3.) der Nachweis der Biosynthese des Cantharidins in der dritten Anhangsdrüse des männlichen Genitalapparates von Lytta vesicatoria legt die Beteiligung von enzymatischen Reaktionen nahe, die mit der Prostaglandin-Biosynthese zusammenhängen ^{f6)}.

f6)

Zur Biosynthese von Prostaglandinen vgl. ⁹⁰⁾. Die Charakterisierung der Prostaglandin-Synthase in den Grillen Acheta domestica und Telegrillus commodus gelang Brady ⁹¹⁾ bzw. Tobe ⁹²⁾. Die Resultate von Loher ⁹³⁾ und Setty ⁹⁴⁾ deuten auf eine Uebertragung von Prostaglandinen während der Kopulation von männlichen auf weibliche T. commodus und Bombyx mori hin.

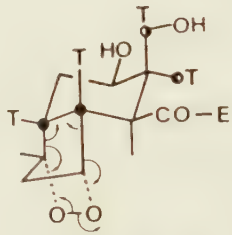
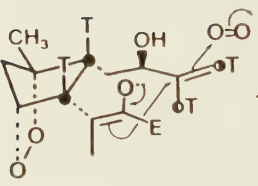
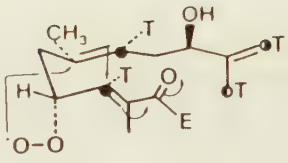
Wie in Schema 19 angedeutet, zeigt sich eine auffallende Analogie zwischen der Bildung des Cantharidins aus Farnesol und der Fragmentierung des Prostaglandinvorläufers 8,11,14-Eicosatriensäure in Malondialdehyd (37) und 12-Hydroxy-5,8,10-trienheptadecensäure (38) unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff.

Schema 19

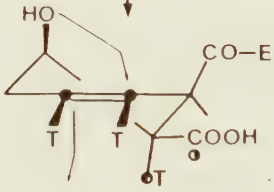
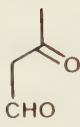


Schema 19 - Forts.

$(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -39

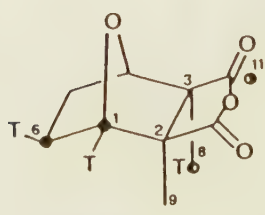


$(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -40



$(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -42

41



$(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -43

Die Umwandlung von Farnesol (^3H , ^{14}C)-14 in eine für das Enophil Sauerstoff akzeptable Struktur (^3H , ^{14}C)-39 beinhaltet eine Reihe von zunächst willkürlich erscheinenden Transformationen, s. Schema 19: das sind die oxidative Abspaltung von C-1, die Einführung einer Doppelbindung an C-4 und die Isomerisierung der Doppelbindung an C-6 des Farnesols nach C-7, weiterhin wird die terminale Doppelbindung von (^3H , ^{14}C)-14 mit Hilfe einer bezüglich der Methylgruppen unspezifischen En-Reaktion (Randomisierung der ^3H - und ^{14}C -Markierung) in einen Allylalkohol umgewandelt. Nach Angriff des Sauerstoffs an die C-3,4-Doppelbindung des über eine Esterfunktion an das Enzym gebundenen (^3H , ^{14}C)-39 werden die beiden fehlenden Bindungen zur Ausbildung des Cantharidin-Kohlenstoffgerüsts geknüpft und durch Fragmentierung des Endoperoxids (^3H , ^{14}C)-40 3-Oxobutanal (41) abgespalten. Dabei entsteht eine Z-Doppelbindung in (^3H , ^{14}C)-42, die durch die OH-Gruppe unter Ausbildung der Aetherbrücke des Cantharidins angegriffen wird.

Die mögliche Kooperation von zwei separierten Enzymsystemen, der Terpenbiosynthese und des Fettsäurestoffwechsels, würde auch mit der experimentellen Tatsache übereinstimmen, dass die „Hot-Trap“ - Versuche für Farnesol bzw. dessen Pyrophosphat erfolgreich

verlaufen, s. 2.9 , wohingegen die Isolierung von Zwischenprodukten der Umwandlung von Farnesol (14) in Cantharidin (1) offensichtlich problematisch ist f7) .

f7)

Die Extraktion von 230g getrockneter Lytta vesicatoria mit Pentan ergab im nicht verseifbaren Anteil mittels GC/MS identifizierte, gesättigte Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C_{11} bis C_{21} (0,27% des Trockengewichtes) sowie 0,02% Cholesterin (10). Der verseifbare Anteil enthielt 5,5% eines Fettsäuregemisches bestehend aus Laurin-, Myristin-, Palmitolein-, Palmitin-, Linol-, Linolen-, Oel- und Stearinsäure, die als Methylester mittels GC/MS nachgewiesen wurden.

Aus einem separaten Aetherextrakt des Käferpulvers wurden noch 0,08% Uracil und 0,16% Glycerin isoliert. Biosynthetisch relevante Verbindungen konnten nicht identifiziert werden 95) .

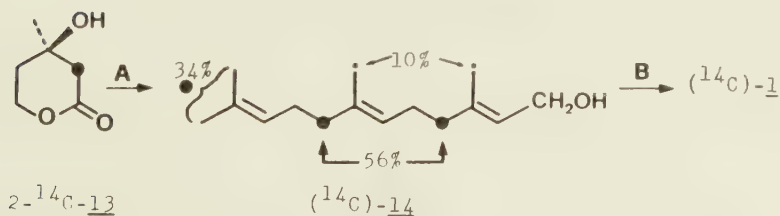
2.9. Bildung des Biosynthesezwischenproduktes

Farnesol (14)

2.9.1. Einleitung

Frühere Experimente haben gezeigt, dass Farnesol (14) als Zwischenprodukt der Biosynthese des Cantharidins (1) isoliert werden kann ⁹⁶). Die Anwendung von zwei unabhängigen Abbaumethoden ergab die im Schema 20 dargestellte Verteilung der Radioaktivität im Farnesol (^{14}C)-14 nach Inkorporation von 2- ^{14}C -Mevalonat (2- ^{14}C -13) in männliche Lytta vesicatoria.

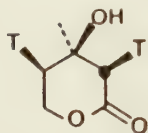
Schema 20



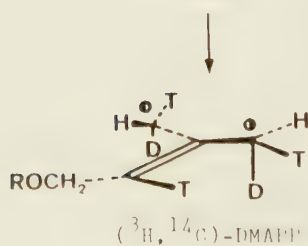
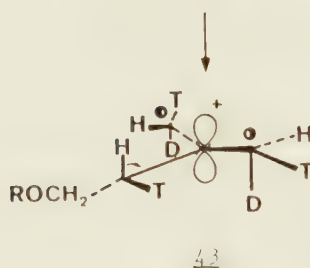
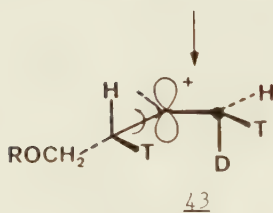
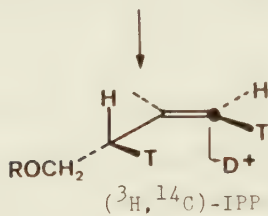
Nachdem wir eine Randomisierung der terminalen Methylgruppen von 11'-(^3H , ^{14}C)-14 während der Umwandlung in (^3H , ^{14}C)-1b nachgewiesen hatten, s. 2.8.1.2, war es naheliegend zu prüfen, ob eine derartige Unspezifität bereits bei der Bildung des Farnesols (14) aus Mevalonat (13) auftritt.

Denkbar ist eine solche Randomisierung während der in Schema 21 dargestellten Reaktionssequenz.

Schema 21



$(2R, 4R)$ -4- ^3H -2-(^3H , ^{14}C)-13



R: $\text{P}_2\text{O}_6^{3-}$

Diese Formulierung ist vereinbar mit Experimenten von Cornforth ⁹⁷⁾, die gezeigt haben, dass die Protonierung des Isopentenylpyrophosphats (IPP) von der re-Seite der Doppelbindung erfolgt, so dass bei entsprechender Markierung, s. Schema 21, eine chirale Methylgruppe entsteht, deren R-Chiralität nach Abbau des enzymatisch gebildeten Farnesols an chiraler Essigsäure bestimmt wurde ⁹⁷⁾.

Die Annahme, dass, ähnlich wie bei der Kettenverlängerung, gleichzeitig mit der Protonierung der Doppelbindung die Addition eines nicht näher identifizierten Nucleophils an C-3 des IPP erfolgt, scheint zumindestens nicht zwingend; denn ein synchron mit der Addition von D^+ verlaufende anti-Elimination von H_{re} an C-2 des IPP erklärt die Resultate von Cornforth ⁹⁷⁾ hinreichend.

Ein Identitätsverlust von C-2 bzw. C-3' des Mevalonats wäre möglich, wenn dieser Prozess nicht synchron verläuft, sondern ein frei drehbares Carbeniumion 43 auftritt, s. Schema 21 ^{f8)}.

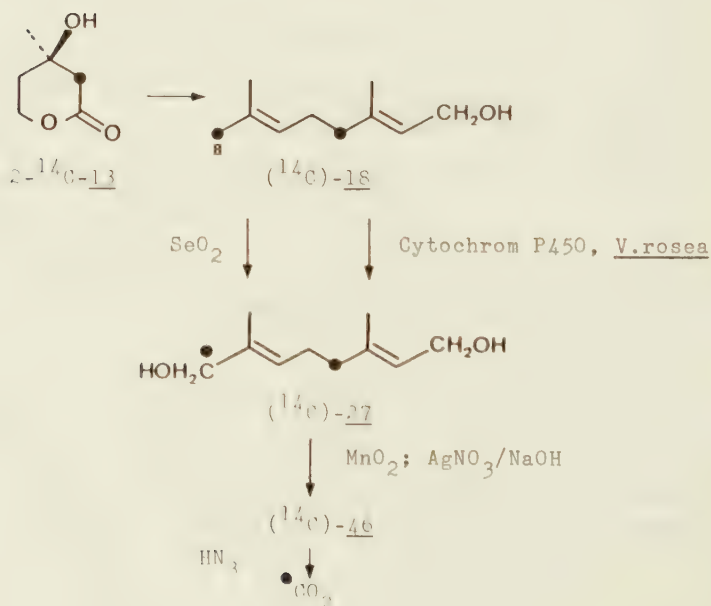
f8)

Der Uebersichtlichkeit halber wird in der Diskussion und im Schema 21 das Gleichgewicht zwischen IPP und DMAPP nicht berücksichtigt ⁹⁷⁾, zu diesem Problem vgl. 2.9.4.

Unseres Wissens sind nur zwei Arbeiten bekannt, die sich experimentell mit dem Problem der Randomisierung von C-2 des Mevalonats bei der Biosynthese acyclischer Terpene auseinandergesetzt haben. Die am häufigsten in diesem Zusammenhang zitierte Publikation stammt von Birch ⁹⁸⁾ und behandelt die Biosynthese des terpenoiden Teils von Mycelianamid (44) aus Penicillium griseofulvum. Nach Applikation von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) wurde der radioaktive Geranylrest (¹⁴C)-45 von (¹⁴C)-44 reduktiv abgetrennt und anschliessend einem Kaninchen oral verabreicht, aus dessen Urin man die strukturbekannte Hildebrandt-Säure (¹⁴C)-46 isolierte, s. Schema 22. Der Abbau von (¹⁴C)-46 mit Hilfe der Schmidt- und der Kuhn-Roth-Reaktion lieferte jeweils die Summe der Radioaktivität von C-1 + C-8 bzw. C-3' + C-7' + C-3 + C-7. Daraus ergab sich eine Randomisierung der ¹⁴C-Aktivität von 80:20 (zugunsten der E-Methylgruppe) in den terminalen Methylgruppen von (¹⁴C)-44. Es bleibt unklar, ob diese Aktivitätsverteilung ursächlich auf die Biosynthese des Mycelianamids (¹⁴C)-44 zurückzuführen ist oder eine Folge der verwendeten analytischen Methoden ist. Die Stereoselektivität der hier wirksamen ω -Oxidase ist nicht untersucht worden. Einwenden lässt sich weiterhin, dass Kontrollexperimente fehlen, die eine ähnliche Reaktivität beider Carbonylgruppen der Hilde-

In einer anderen kürzlich erschienenen Arbeit von Banthorpe ⁸⁸⁾ werden Experimente zur Untersuchung der Biosynthese von Geraniol (18) in Rosa dilecta nach Applikation von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) beschrieben. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den terminalen Methylgruppen von (¹⁴C)-18 kamen die beiden in Schema 23 dargestellten Abbauvarianten zur Anwendung, die durch Oxidation mit SeO₂ bzw. der Monoterpenhydroxylase aus Vinca rosea über (¹⁴C)-27 führten.

Schema 23



Das Vorgehen von Banthorpe ist prinzipiell fragwürdig, denn beide Abbaumethoden enthalten als wesentliche Schritte Oxidationsreaktionen, die bezüglich einer Randomisierung mechanistisch nicht untersucht worden waren, von denen man demzufolge nur auf Grund der Produktanalyse annehmen konnte, dass die erforderliche Stereoselektivität vorliegt.

Eigenartigerweise erhielten die Autoren ⁸⁸⁾ mit beiden Methoden das gleiche Resultat : C-8 des Geraniols (¹⁴C)-18 enthält ~50% der molaren Aktivität, s. Schema 23. Man kann zwar nicht ausschliessen, dass dies tatsächlich das „richtige“ Ergebnis ist, aber unter Berücksichtigung unserer Resultate zum Mechanismus der SeO₂-Oxidation, s. 3.3 , ist die Interpretation der radioaktiven Zählungen (< 25 dpm/mg) unvereinbar mit den Experimenten, von denen sie hergeleitet sind.

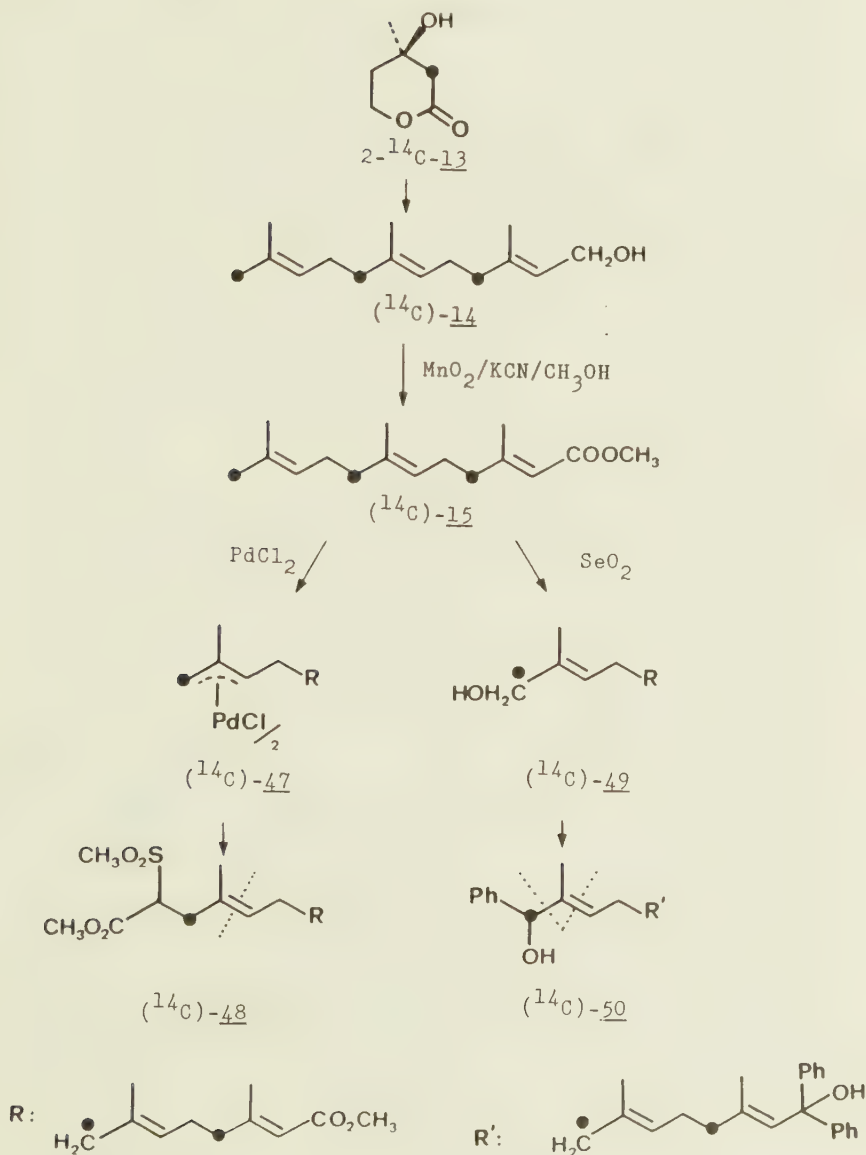
2.2.2. Abbaumethoden zur Bestimmung der Radio-
aktivitätsverteilung in den terminalen
Methylgruppen von (^{14}C)-Farnesol ((^{14}C)-14)

Zum Nachweis einer Verteilung der Radioaktivität auf die beiden Atome C-11' und C-12 von (^{14}C)-14 nach Injektion von 2- ^{14}C -13 in männliche Lytta vesicatoria zogen wir zwei chemische Reaktionen in Betracht, s. Schema 24, die bei Anwendung auf Farnesylsäuremethylester (^{14}C)-15, der in guten Ausbeuten aus (^{14}C)-14 darstellbar ist ¹⁰⁰), nach Angaben der Literatur eine Differenzierung beider Methylgruppen ermöglichen sollte:

- 1.) eine nucleophile Addition an den π -Allyl-Pd-Komplex (^{14}C)-47, die stereoselektiv (^{14}C)-48 ergibt ¹⁰¹) und
- 2.) eine Allyloxydation von (^{14}C)-15 mit SeO_2 ^{102, 103}), welche zum E-Allylalkohol (^{14}C)-49 führt.

Die in 3.2 , 3.3 und 3.4.9 beschriebenen Untersuchungen beider Reaktionen mit Hilfe ^{13}C -markierter Modellverbindungen ergaben, dass ein Abbau von (^{14}C)-15 über den π -Allyl-Pd-Komplex (^{14}C)-47 nicht in Frage kommt, während die Allyloxydation von (^{14}C)-15 mit SeO_2 bzw. den Estern der selenigen Säure eine geeignete Methode zur Lösung der Problemstellung ist.

Schema 24



2.9.3. Inkorporation von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13)

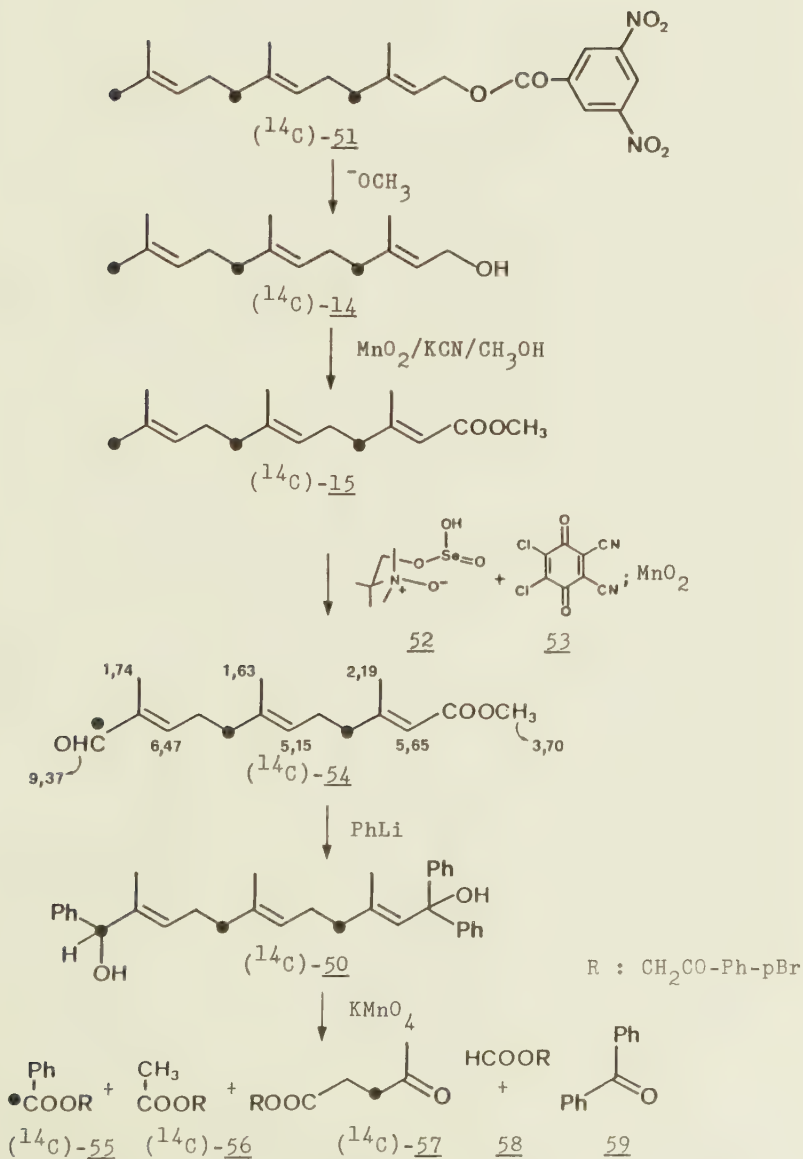
Nach Injektion von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) in 110 männliche Lytta vesicatoria arbeitete man die Insekten mit Hilfe des von uns bereits früher beschriebenen ⁹⁶⁾ basischen Aufschlussverfahrens und anschliessender Inkubation mit alkalischer Phosphatase (E.C.3.1.3.1.) auf und isolierte nach Zugabe von inaktivem E,E-Farnesol und Umsetzung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid den Ester (¹⁴C)-51, der bis zur konstanten spezifischen Aktivität kristallisiert wurde, s. Tabelle 11.

Anschliessende Methanolyse ergab (¹⁴C)-14, das für den Ablauf nach Schema 25 verwendet wurde. Mit 86% Ausbeute erhielt man den Ester (¹⁴C)-15 nach einer Vorschrift von Corey ¹⁰⁰⁾ und oxidierte nach der von uns entwickelten Methode, s.

3.4.8 mit dem Selenit 52 in Gegenwart von DDQ 53.

Man erhielt in 69% ein Gemisch von (¹⁴C)-54 und dem korrespondierenden Alkohol (¹⁴C)-49, das nach quantitativer Oxidation mit MnO₂ ¹⁰⁰⁾ den Aldehydester (¹⁴C)-54 lieferte, der gaschromatographisch zu 92,5% das E,E,E-Isomere neben 4,2% Z,E,E- (¹⁴C)-54 und 3,3% nicht identifizierter Beimengungen enthielt. (¹⁴C)-54 ist weiterhin charakterisiert durch sein ¹H-NMR-Spektrum, dessen Resonanzen im Schema 25 angegeben sind; Hinweise auf das Vorkommen des 10 Z- (¹⁴C)-54 fehlen ¹⁰⁴⁾.

Schema 25



Zu einer ätherischen Lösung von (^{14}C)-54 wurde bei 0° unter Argon ein 1,2 molarer Ueberschuss von Phenyl-lithium in Benzol/Aether injiziert, anschliessend auf 25° erwärmt und nach 2 Stunden Reaktionsdauer aufgearbeitet, chromatographiert und bei $220^\circ/10^{-4}$ Torr destilliert. Man erhielt das nach NMR, MS und IR einheitliche Diol (^{14}C)-50 mit einer Ausbeute von 85%. Zur Spaltung der Doppelbindungen wurde (^{14}C)-50 in Methylenchlorid/12% Essigsäure bei 0° gelöst und ein dreimolarer Ueberschuss an KMnO_4 sowie 1 Äquivalent 18-Crown-6 hinzugegeben ¹⁰⁵). Nach 15 Stunden Reaktionsdauer bei 25° wurden die überschüssigen Oxidationsmittel mit NaHSO_3 reduziert, das Benzophenon 59 (Ausbeute 66%) durch Extraktion entfernt und zur Derivatisierung der Säuren die alkalische wässrige Phase bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in DMF aufgenommen, auf pH 9 gestellt und mit zwei Äquivalenten p-Bromphenacylbromid versetzt. Auf analytischen DC-Platten konnten die Ester (^{14}C)-55 und die Mischung der Ester (^{14}C)-56 und 58 von (^{14}C)-57 abgetrennt werden. Die Ester 58 und (^{14}C)-56 wurden anschliessend auf HPLC (Kieselgel, Hexan/Aether 7:3) getrennt und auf diese Weise kristalline, HPLC-reine Präparate (^{14}C)-55 und (^{14}C)-56 erhalten, die zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendet wurden, s. Tabelle 11.

Tabelle 11

Abbau von (^{14}C)-14 nach Inkorporation von 2- ^{14}C -Mevalonat (2- ^{14}C -13) in

110 männliche Lytta vesicatoria

rel. %

dpm/mmol

^{14}C

100

$3,37 \times 10^5$

20,1

$6,77 \times 10^4$

13,6

$4,59 \times 10^4$



(^{14}C)-14

Ph-COOR

(^{14}C)-55

CH_3COOR

(^{14}C)-56

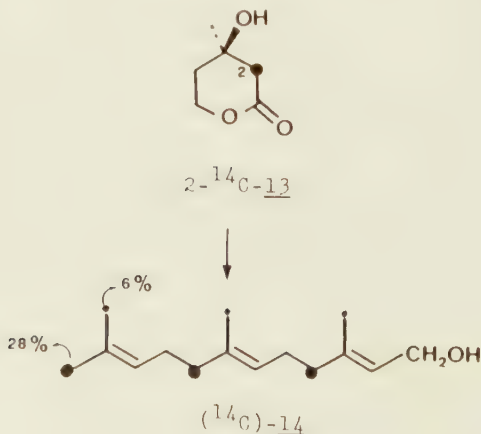
R : $\text{CH}_2\text{CO-Ph-pBr}$

1
2
3
4

Die in Tabelle 11 wiedergegebenen Resultate zeigen, dass 33,7% der molaren Aktivität des biosynthetisierten Farnesols (^{14}C)-14 in den terminalen Methylgruppen lokalisiert sind, wobei 20,1% an C-12 und 13,6% an C-11 nachgewiesen wurden.

Unter der Voraussetzung, dass die Oxidation von (^{14}C)-15 mit dem Selenit 52 die gleiche Stereoselektivität aufweist, wie sie an einer ^{13}C -markierten Modellverbindung bestimmt wurde, s. 3.4.9, bedeutet dieses Ergebnis eine Randomisierung der ^{14}C -Markierung an C-2 des Mevalonats von 82:18, s. Schema 26, im Verlauf der Bildung des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol ¹⁰⁶⁾. Als mechanistische Erklärung dieses Befundes bietet sich die im Schema 21 dargestellte Formulierung an, s. 2.9.1.

Schema 26



2.9.4. Synthese und Inkorporation von 3'-¹⁴C-

Mevalonat (3'-¹⁴C-13)

Da die Stereoselektivität der für den Abbau von Farnesol entscheidenden Reaktion - (¹⁴C)-15 → (¹⁴C)-54, s. Schema 25 - nur 65:35 zugunsten von C-12 des Farnesols (¹⁴C)-14 beträgt und damit die Differenz zwischen vollständiger Selektivität der enzymatischen Umwandlung von 2-¹⁴C-13 in (¹⁴C)-14 und einer 100%igen Randomisierung von 50% auf 15% schrumpft, schien es uns notwendig, das in 2.9.3 beschriebene Experiment mit 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) durch den Abbau eines aus 3'-¹⁴C-Mevalonat (3'-¹⁴C-13) biosynthetisierten Farnesols (¹⁴C)-14a zu ergänzen.

Demzufolge wurde eine Synthese von 3'-¹⁴C-Mevalonat (3'-¹⁴C-13) gemäß Schema 27 ausgeführt ^{f9)}.

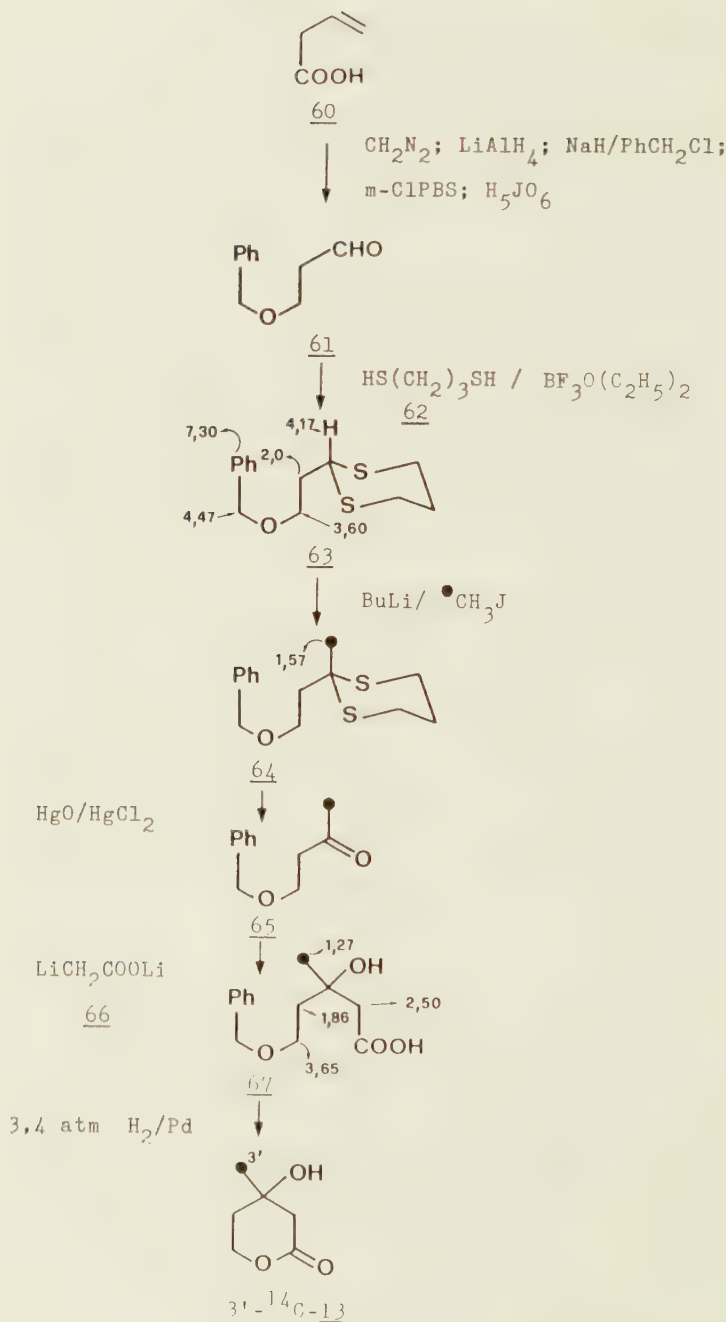
Ausgehend von Vinyllessigsäure(60) wurde in fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 42% 3-Benzylxypropenal (61) dargestellt, das in Gegenwart von BF₃-Aetherat mit 1,3-Dimercaptopropan (62) umgesetzt wurde ¹⁰⁸⁾ und in 91% das Thioacetal 63 lieferte. Nach Metallierung mit Butyllithium

f9)

Die Synthese von 61 orientiert sich im wesentlichen an unseren Erfahrungen bei der Herstellung von 11'(³H, ¹⁴C)-Farnesol (11'(³H, ¹⁴C)-14), s. Schema 14.

Bezüglich alternativer Synthesewege zu 3'-¹⁴C-Mevalonat (3'-¹⁴C-13) vgl. Scott ¹⁰⁷⁾ und die dort zitierte Literatur.

Schema 27



wurden bei $-170^{\circ}/10^{-4}$ Torr 2mCi $^{14}\text{CH}_3\text{J}$ einkondensiert und anschliessend während zwei Stunden bei -30° gerührt. Nach Aufarbeitung und präp.DC erhielt man mit einer Ausbeute von 58,3% GC- und radiodünnschichtchromatographisch reines $1'-^{14}\text{C}$ -64, das in jeder Hinsicht identisch war mit inaktivem Thioketal 64, das zum Vergleich aus käuflichem 4-Benzylloxy-2-butanon (65) erhalten wurde.

Daraufhin entfernte man die Schutzgruppe durch Reaktion mit HgO/HgCl_2 in Methanol/Wasser ¹⁰⁹⁾ und erhielt mit 80,4% das Benzylloxyketon $1-^{14}\text{C}$ -65 mit einer spezifischen Aktivität von 2,2 mCi/mmol. $1-^{14}\text{C}$ -65 wurde dann bei 0° in eine Lösung des aus LDA und Essigsäure in THF hergestellten Dilithiumsalzes 66 injiziert und anschliessend während 14 Stunden bei 25° umgesetzt ¹¹⁰⁾. Nach Aufarbeitung isolierte man in 41% die Hydroxysäure $3'-^{14}\text{C}$ -67, die mittels Hydrogenolyse an Palladium bei 3,4 atm H_2 mit 81% in $3'-^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelaktone ($3'-^{14}\text{C}$ -13) übergeführt wurde. Die Identifizierung der radiodünnschichtchromatographisch reinen Verbindung erfolgte durch GC-Vergleich mit inaktivem 13.

Die Injektion von $3'-^{14}\text{C}$ -Mevalonat ($3'-^{14}\text{C}$ -13) in 78 männliche Lytta vesicatoria führte sowohl zur Bildung von radioaktivem Cantharidin, s. Tabelle 12 und Schema 28, als auch zu radioaktivem Farnesol ^{14}C -14a, das wie in 2.9.3. beschrieben, isoliert und abgebaut wurde. Die Zählresultate der relevanten Ester (^{14}C)-55* und (^{14}C)-56* sind in Tabelle 12

Tabelle 12

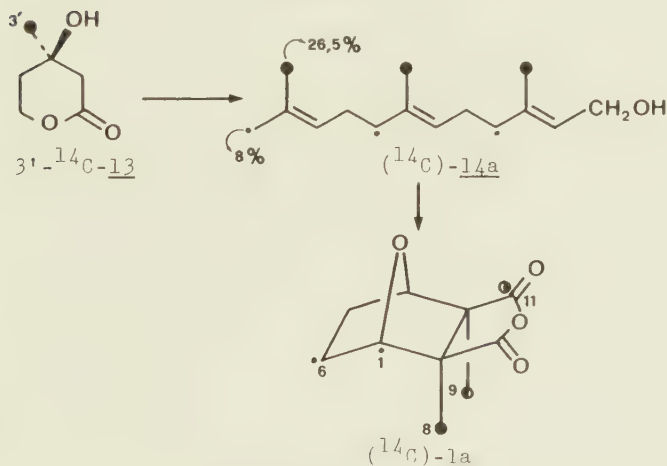
Abbau von (^{14}C)-14a nach Inkorporation von 3',- ^{14}C -Mevalonat (3',- ^{14}C -13) in
78 männliche Lytta vesicatoria

	dpm/mmol ^{14}C	rel. %
 $(^{14}\text{C})\text{-14a}$	$4,11 \times 10^5$	100
Ph-COOR $(^{14}\text{C})\text{-55}^*$	$5,94 \times 10^4$	14,5
CH_3COOR $(^{14}\text{C})\text{-56}^*$	$8,23 \times 10^4$	20,0
 $(^{14}\text{C})\text{-1a}$	$6,93 \times 10^5$	100
CH_3COOH $\text{C}-(2+3+8+9)$	$2,30 \times 10^5$	66,4

R : $\text{CH}_2\text{CO-Ph-pBr}$

angegeben und dokumentieren innerhalb der Fehler-
grenze eine zum Experiment mit 2-¹⁴C-Mevalonat
(2-¹⁴C-13) komplementäre Radioaktivitätsverteilung
im biosynthetisierten Farnesol (¹⁴C)-14a, s. Schema 28
d.h. eine Verteilung von 77:23 in den terminalen Methyl-
gruppen, zugunsten der Z-Methylgruppe C-11', nach
Applikation von 3'-¹⁴C-13.

Schema 28



Auf der Grundlage dieser beiden Versuche ergibt sich
folgende Situation:

Die Bildung des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol
erfolgt unter teilweiser Randomisierung (80:20) der
Markierung an C-2 bzw. C-3' des Mevalonats. Als
Erklärung für diesen Befund bietet sich ein nicht
synchroner Verlauf der Isomerisierung von IPP $\rightleftharpoons$ DMAPP
an, s. 2.9.1 , Schema 21. Da es sich hierbei um eine

Gleichgewichtsreaktion handelt ⁹⁷⁾, sollte diese Randomisierung nicht nur in den terminalen Methylgruppen sondern auch in den entsprechenden C-Atomen innerhalb der Kette des Sesquiterpens zu finden sein. Diese Erwartung wird qualitativ bestätigt durch das von uns bereits früher publizierte ⁹⁶⁾ und in 2.9.1. kommentierte Resultat sowie durch den Kuhn-Roth-Abbau des aus 3'-¹⁴C-Mevalonat (3'-¹⁴C-13) biosynthetisierten Cantharidins (¹⁴C)-1a, s. Tabelle 12. Die Essigsäure enthielt nicht 77% der molaren Aktivität von (¹⁴C)-1a, wie man bei einem mit dem Faktor 1,2 bevorzugten Einbau der dritten Isopreneinheit erwarten würde, s. 2.7, sondern nur 66,4%, was auf eine Markierung von 10,6% der molaren Aktivität von (¹⁴C)-1a an C-1 und C-6 hindeutet ¹⁰⁶⁾.

3. Mechanistische und präparative Aspekte der stereo- und regioselektiven Funktionalisierung allylischer Methylgruppen

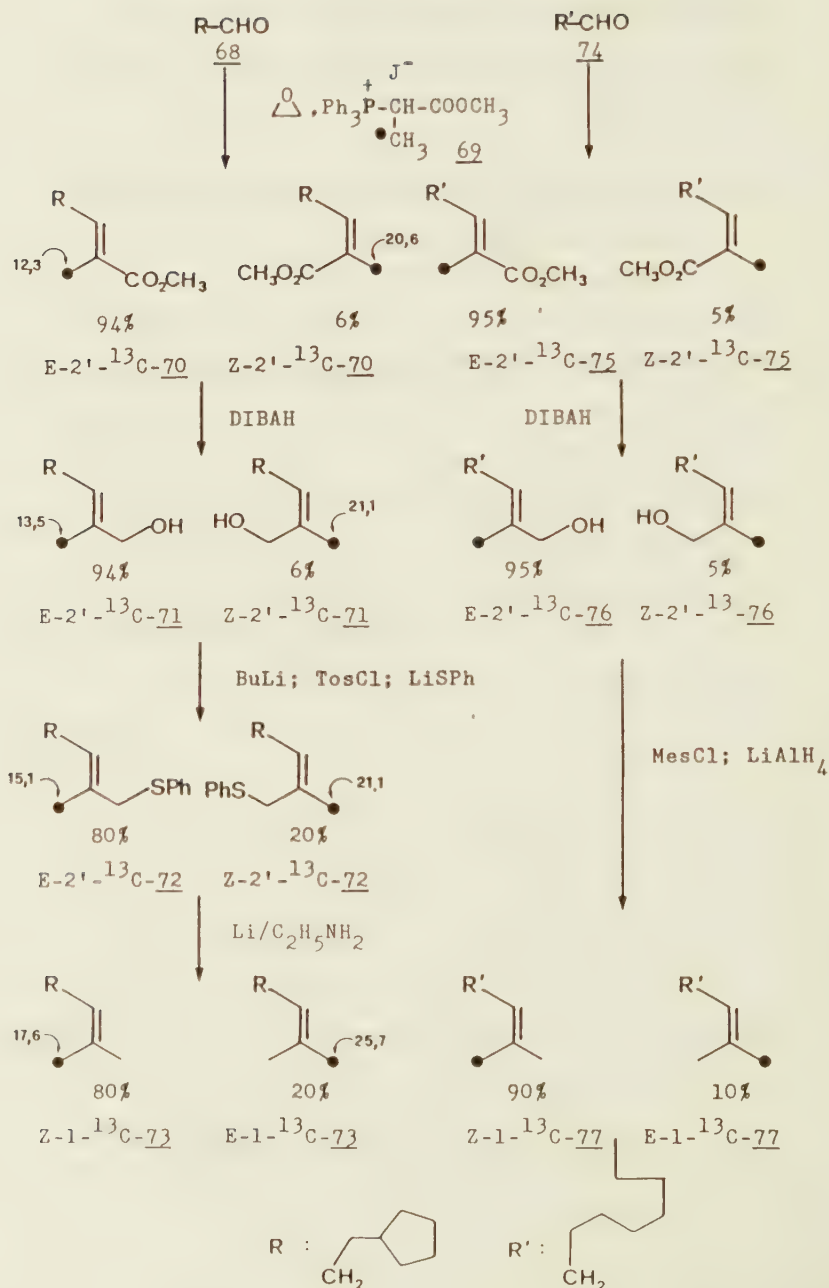
3.1. Darstellung ^{13}C -markierter Olefine für mechanistische Untersuchungen

Wie bereits erwähnt, s. Seite 80 , zog man zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den terminalen Methylgruppen des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol sowohl eine Funktionalisierung via den terminalen π -Allyl-Pd-Komplex (^{14}C)-47 als auch eine Oxidation mit Hilfe von SeO_2 in Erwägung.

Da es nicht bekannt war, ob diese Reaktionen unter Retention einer spezifischen Markierung in einer der beiden terminalen Methylgruppen verlaufen würden, musste ihre Stereoselektivität mit Hilfe ^{13}C -markierter Verbindungen untersucht werden.

Zu dem Zweck wurden gemäss Schema 29 die Olefine 1- ^{13}C -73 und 1- ^{13}C -77 dargestellt. Die Synthesewege sind bezüglich der Einführung der ^{13}C -Markierung via $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (90% ^{13}C) bzw. dem daraus hergestellten Wittig-Reagenz identisch, unterscheiden sich aber in Bezug auf die Umwandlung der Hydroxymethylgruppe in die Methylgruppe, wobei sich die Darstellung von 1- ^{13}C -73 an der Synthese von 11'-(^3H , ^{14}C)-14 orientiert, um einen Hinweis über die Isotopomerenreinheit des applizierten radioaktiven Vorläufers zu erhalten.

Schema 29



Dabei stellte man fest, dass sich bei der Umwandlung von $2'-^{13}\text{C}$ -71 in den Thioäther $2'-^{13}\text{C}$ -72 das Verhältnis der markierten Verbindungen um 14% zugunsten des unerwünschten $\text{Z}-2'-^{13}\text{C}$ -72 ändert, so dass im Endprodukt dieser Synthese die Kohlenwasserstoffe $\text{Z}-1-^{13}\text{C}$ -73 / $\text{E}-1-^{13}\text{C}$ -73 im Verhältnis 80:20 vorlagen. Die Verteilung der ^{13}C -Markierung beruht wahrscheinlich auf einer $\text{S}_{\text{N}}2'$ -Reaktion bei der Addition von LiSPh an das als Zwischenprodukt auftretende Allyltosylat, s. Schema 29. Man muss also annehmen, dass das den männlichen Lytta vesicatoria injizierte synthetische $11'-(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -14, s. Seite 59, 20% vom Stereoisotopomeren $12-(^3\text{H}, ^{14}\text{C})$ -14 enthielt ^{f10}). Dieser Befund ändert nichts an der Aussagekraft des Biosyntheseexperimentes, da nachweislich eine vollständige Randomisierung von C-11' und C-12 des Farnesols bei der Umwandlung in Cantharidin auftritt.

f10)

Stereoisotopomere sind Verbindungen, deren Konfigurationsunterschied nur auf Grund (mindestens) einer isotop-markierten Position zu Stande kommt, während Konstitutionsisotopomere einen Konstitutionsunterschied aufweisen, der nur durch (mindestens) eine Isotopenmarkierung erzeugt wird.

In der zweiten in Schema 29 dargestellten Synthese wurde zur Umwandlung von 2'-¹³C-76 in 1-¹³C-77 eine Modifikation der Vorschrift von Stephenson ¹¹¹⁾ angewendet. Zu dem Zweck versetzte man bei - 60° in Gegenwart von Triäthylamin eine ätherische Lösung der Alkohole E-2'-¹³C-76 und Z-2'-¹³C-76 (95:5) mit Mesylchlorid, rührte 2 Stunden bei -30°, isolierte das Mesylat bei 0-4° durch Aufarbeitung mit HCl und reduzierte anschliessend mit LiAlH₄ in THF. Man erhielt nach präp.DC. und Destillation die stereoisotopomeren Olefine Z-1-¹³C-77 und E-1-¹³C-77 (90:10) in einer Ausbeute von 76%. Dieser Sequenz ist also der Vorzug zu geben, da sie mit doppelt so hoher Ausbeute und nur 5% anstelle von 14% Randomisierung der ¹³C-Markierung verläuft. Die ¹³C-Resonanzen der markierten Positionen ¹¹²⁾ sind in Schema 29 angegeben, R und R' haben keinen signifikanten Einfluss auf diese Werte. Die Isomerenverhältnisse wurden den rauschentkoppelten ¹³C-NMR-Spektren entnommen; diese Werte waren innerhalb der Fehlergrenze von ca. 3% identisch mit den ¹H-NMR-Daten und den, wenn möglich, gaschromatographisch bestimmten Anteilen.

Z-1-¹³C-73/E-1-¹³C-73 wurden für die Untersuchung der Allyloxidation mit SeO₂ verwendet, während Z-1-¹³C-77/E-1-¹³C-77 für die Experimente zum Mechanismus der Bildung von acyclischen π -Allyl-Pd-Komplexen und der Oxidation

mit Estern der selenigen Säure eingesetzt wurde ¹⁰⁶⁾.

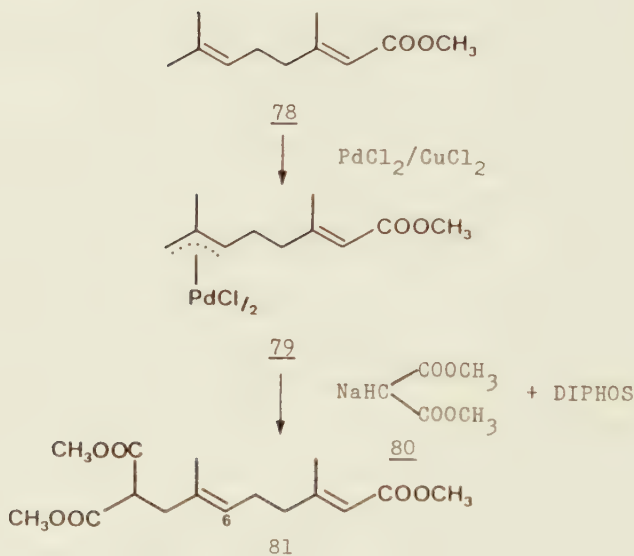
3.2. Bildung und Struktur acyclischer π -Allyl-Pd-Komplexe

Die synthetische Bedeutung von π -Allyl-Pd-Komplexen, die durch Einwirkung von Pd(II)-Salzen aus den entsprechenden Olefinen zugänglich sind, ist zuerst von Tsuji ¹¹³⁾ erkannt und in den letzten Jahren eindrucklich von Trost ¹¹⁴⁾ demonstriert worden. Trost konnte zeigen, dass diese stabilen, kristallinen Komplexe stereo- und regioselektiv gebildet werden ¹¹⁵⁾ und in Gegenwart von Ph_3P , DIPHOS oder HMPT mit gut stabilisierten Nukleophilen unter Ausbildung von neuen C-C-Bindungen reagieren ¹¹⁶⁾. Dabei entsteht z.B. aus 79, dem π -Allyl-Pd-Komplex des Geranyl-säuremethylesters 78 mit Natriumdimethylmalonat 80 nahezu quantitativ das Alkylierungsprodukt 81 mit E-Konfiguration an der C-6-Doppelbindung, s. Schema 30.

Auf Grund dieser Experimente schien es möglich, das Problem der Differenzierung der beiden terminalen Methylgruppen des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol zu lösen.

Zunächst aber wurde die Stereoselektivität der Komplexbildung untersucht, indem man das ^{13}C -markierte Olefin 1- ^{13}C -77, s. 3.1, bestehend aus den Stereoisotopomeren Z-1- ^{13}C -77 und E-1- ^{13}C -77 im Verhältnis 90:10 nach den Angaben von Trost ¹¹⁵⁾ mit PdCl_2 in Gegenwart von $\text{CuCl}_2/\text{NaOAc-HOAc}$ zur Reaktion brachte. Nach 50% Umsatz wurde

Schema 30

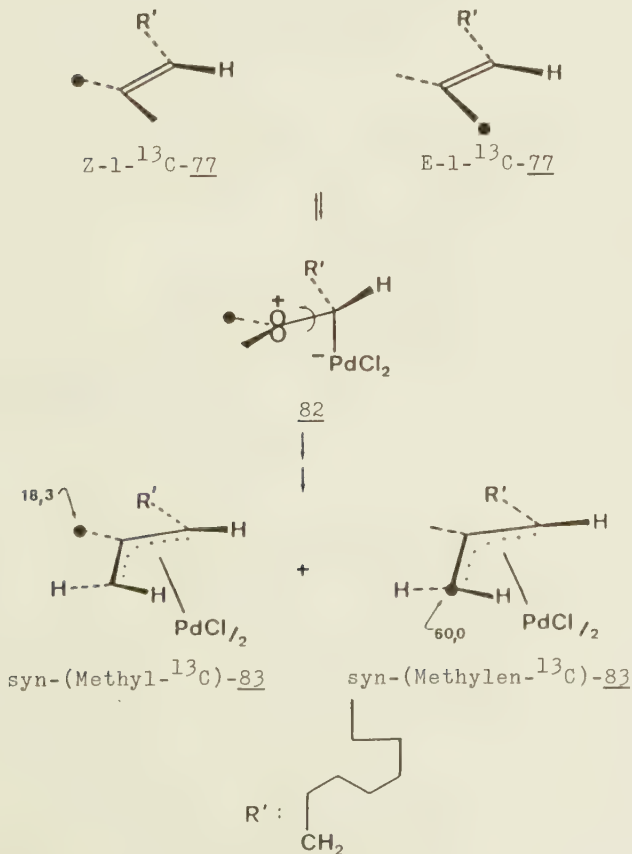


aufgearbeitet und der gelbe, kristalline, ^{13}C -markierte Komplex 83 in 39% sowie das Ausgangsmaterial 1- ^{13}C -77 in 41% Ausbeute isoliert.

Das rauschentkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum des Olefins zeigte die Anwesenheit der Stereoisotopomeren Z-1- ^{13}C -77 und E-1- ^{13}C -77 im Verhältnis 72:28 während im entsprechenden Spektrum des π -Allyl-Pd-Komplexes die Konstitutionsisotopomeren syn-(Methyl- ^{13}C)-83 und syn-(Methylen- ^{13}C)-83 im Verhältnis 55:45 nachgewiesen wurden.

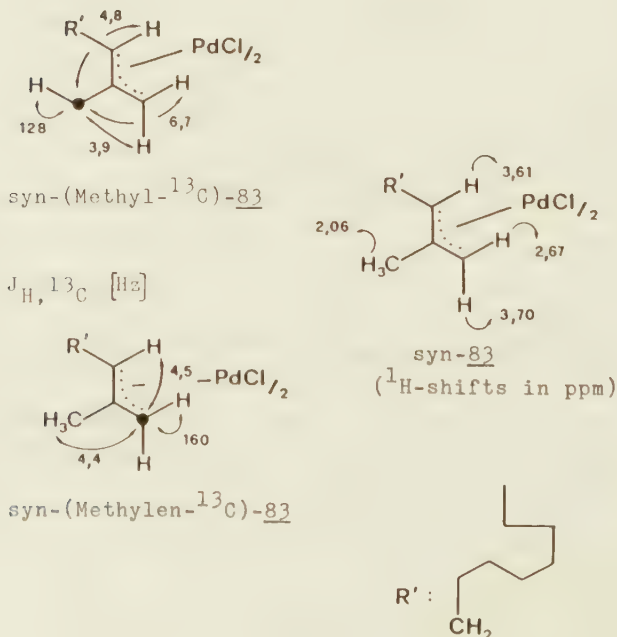
Dieses Resultat impliziert die Existenz des Zwischenproduktes 82 mit einer Pd-C- σ -Bindung, das aus dem Gleichgewicht mit den Olefinen gebildet und nach unselektiver H-Abstraktion aus einer der terminalen Methylgruppen und Oxidation mit CuCl_2 irreversibel in die π -Allyl-Pd-Komplexe umgewandelt wird, s. Schema 31.

Schema 31



Aus den ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren des markierten Pd-Komplexes 83 konnte man ferner die in Schema 32 angegebenen Kopplungskonstanten entnehmen. An diesen Daten fällt auf, dass der ^{13}C -Kern des syn-(Methyl- ^{13}C)-83 (18,3 ppm) eine transoide Kopplung von 6,7 Hz mit dem anti-H der Methylen-Gruppe zeigt und eine cisoide von 3,9 Hz mit dem syn-H, während für die Kopplung mit dem H an C-3 $J=4,8$ Hz gemessen wurden, was in der Tendenz eher auf eine cisoide Kopplung im Widerspruch zur Struktur 83 hindeutet.

Schema 32



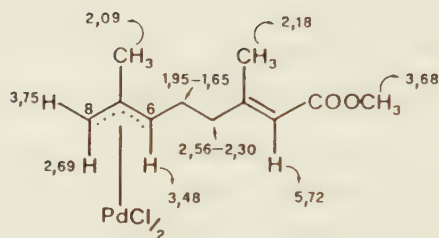
Dieser Befund veranlasste uns, eine genauere spektroskopische Analyse des von uns vor dem markierten Experiment zu Übungszwecken hergestellten π -Allyl-Pd-Komplexes von Geranylsäuremethylester 79 vorzunehmen.

Dieser Komplex war bereits von Trost ¹¹⁵⁾ dargestellt und die Struktur 79 auf Grund des ¹H-NMR-Spektrums festgelegt worden. Die syn-Konfiguration am π -Allylsystem von 79 wurde zugeordnet mit Hilfe literaturbekannter Analogiefälle ¹¹⁷⁾ ¹¹⁸⁾ ¹¹¹⁾ sowie der Argumentation, dass das anti-H an C-8 durch die Abschirmung der Pd-Orbitale relativ zum syn-H an C-8 hochfeldverschoben ist, wohingegen das anti-H an C-6 infolge unsymmetrischer Ladungsverteilung im Komplex bei tieferem Feld absorbiert, s. Schema 33.

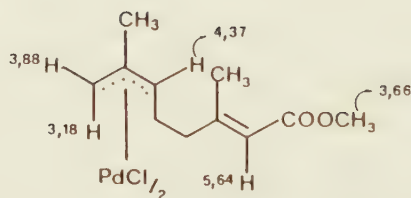
f11)

Als Relais-Verbindung dient der Komplex π -1,3-Dimethylallylpalladiumchlorid, von dem eine Röntgenstrukturanalyse bekannt ist ¹¹⁹⁾.

Schema 33



79



84

Die alternative Struktur 84, mit anti-Konfiguration am π -Allylsystem wurde von Trost ¹¹⁵⁾ nicht in Erwägung gezogen, ist aber ohne shiftunabhängige Argumente nicht auszuschliessen.

In der Absicht, durch die Messung von Differenz-Nuclear-Overhauser-Effekten (NOE) eine Unterscheidung dieser beiden möglichen Strukturen zu treffen, wurden ^1H -NMR-Spektren auf einem AM360-Bruker aufgenommen ^{f12)}. Mit diesem Gerät waren im Gegensatz zu den vorhandenen 200 MHz-Spektren neben den von Trost ¹¹⁵⁾ der Struktur 79 zugeordneten Signalen deutlich getrennte, aus dem Rauschen hervortretende Resonanzen sichtbar, s. Schema 33. Wichtig für die Strukturzuordnung ist die Tatsache, dass bei Einstrahlung in das H bei 3,48 ppm ein positiver NOE für das Proton bei 2,69 ppm beobachtet wird, während die Einstrahlung bei 4,37 ppm keinen NOE bei dem Proton bei 3,18 ppm auslöst. Demzufolge handelt es sich im ersten Fall um anti-Protonen und im zweiten Fall um ein syn- und ein anti-H.

f12)

Die NOE-Experimente wurden von Dr. T. Jenny, Universität Fribourg, ausgeführt; jeweils 8 FID's wurden mit den für Quadratur-Detection üblichen Phasenshifts abwechselungsweise mit Einstrahlung auf das zu untersuchende Signal und Einstrahlung bei gleicher Leistung auf einem signalfreien Bereich mit positivem bzw. negativem Vorzeichen ins Memory akkumuliert; die Einstrahlleistung betrug 50 dB unter 0,1 Watt Entkopplerleistung.

Wir ordnen deshalb dem Hauptisomeren (96%) die von Trost angegebene Struktur 79 zu und dem zu 4% auftretenden Isomeren die Struktur 84. Bemerkenswert ist ausserdem, s. Abb. 5, dass bei Einstrahlungsexperimenten in ein H des einen Isomeren Magnetisierungstransfer (negativer NOE) auf das entsprechende H des anderen Isomeren auftritt und als Folge davon in diesem sekundäre, positive NOE bei räumlich benachbarten Protonen zu beobachten sind ¹⁰⁶⁾. Dieses Resultat lässt sich interpretieren mit einer langsamen reversiblen Umwandlung der π -Allyl-Pd-Komplexe 79 $\rightleftharpoons$ 84 infolge einer π - σ -Reaktion ¹²⁰⁾, s. Schema 34.

Schema 34

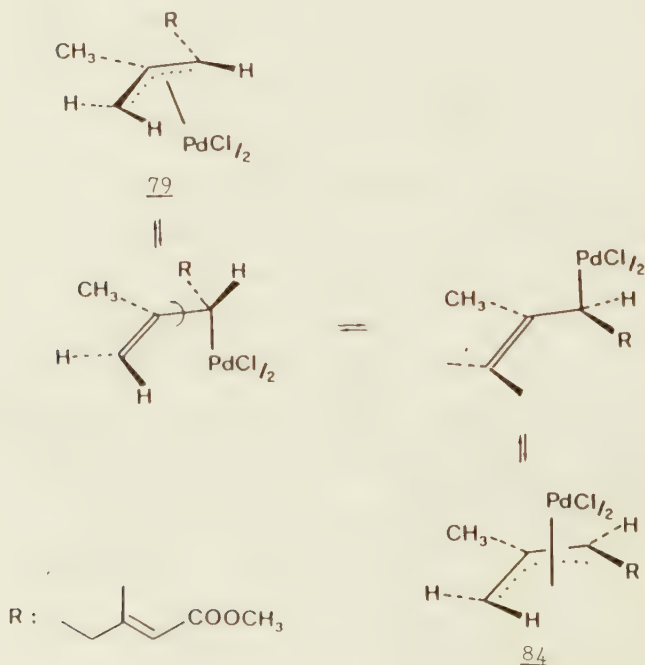
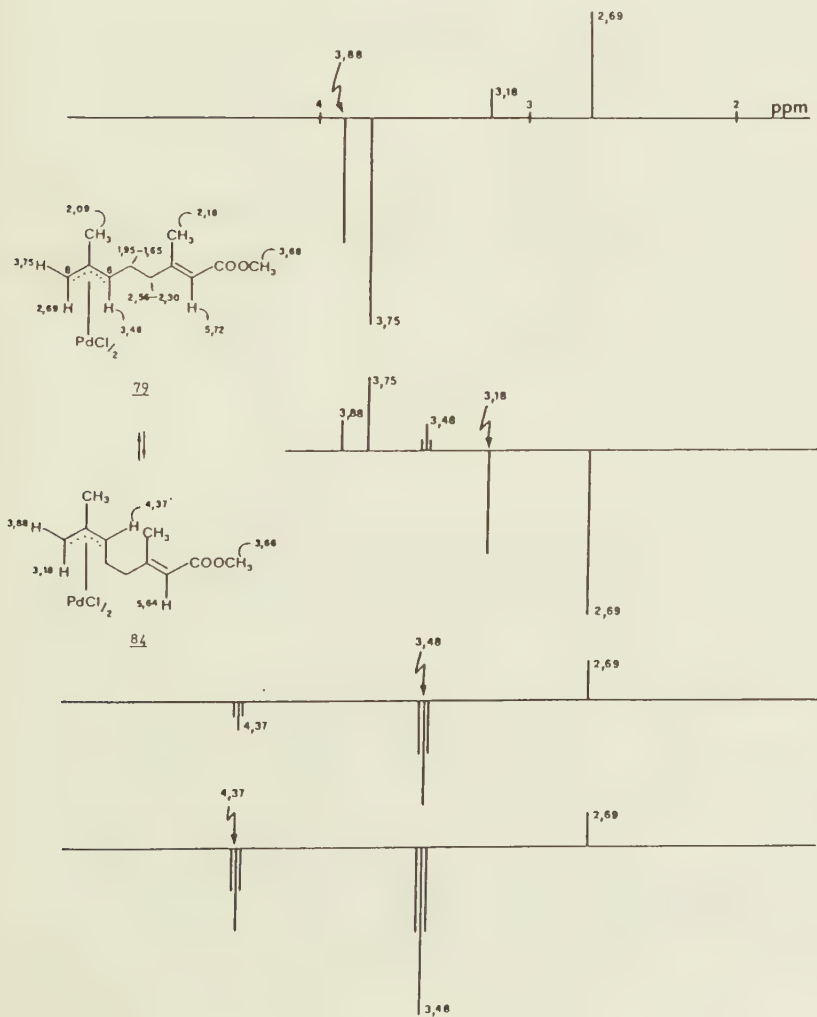


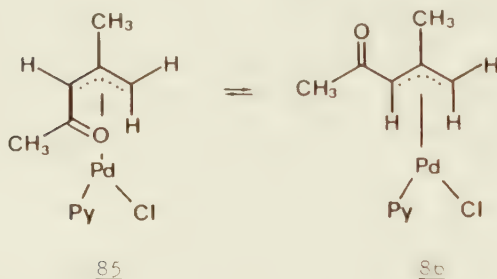
Abbildung 5

Differenz NOE des Gleichgewichtes $79 \rightleftharpoons 84$ in CDCl_3
(relative Signalintensitäten)



Derartige Isomerisierungen sind auch für die 1-Acetyl-2-methylchlorpalladium-Komplexe 85 und 86, s. Schema 35, durch Aufnahme temperaturabhängiger ^1H -NMR-Spektren nachgewiesen worden.

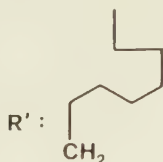
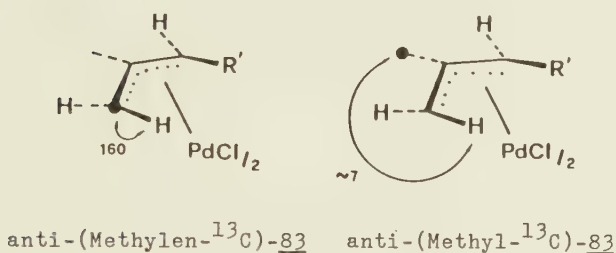
Schema 35



In den anschliessend aufgenommenen 400-MHz- ^1H -NMR-Spektren (AM400, Bruker) des ^{13}C -markierten Komplexes 83 ist die Anwesenheit der Isomeren anti-(Methyl- ^{13}C)-83 und anti-(Methylen- ^{13}C)-83, s. Schema 36, ebenfalls erkennbar. Eine schwach aus dem Rauschen hervortretende Signalgruppe mit Zentrum bei 3,2 ppm und je zwei Seitenbanden im Abstand von 3,5 und 80 Hz sind kennzeichnend für das anti-H am Methylenkohlenstoff. Die am ^{13}C -markierten 83 bestimmte „zu kleine“ $^3J_{\text{H},^{13}\text{C}} = 4,8 \text{ Hz}$ deutet demnach auf eine leichte Pyramidalisierung am höher sub-

stituierten Ende des π -Allylsystems hin.

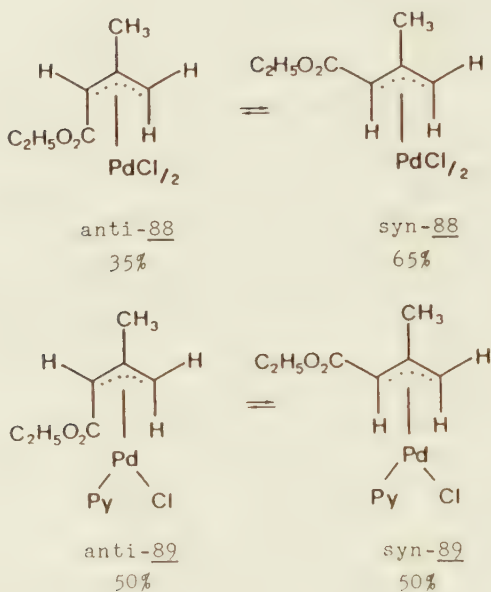
Schema 36



Da es sich offenbar um ein Detektionsproblem handelt, ist es denkbar, dass die hier beobachtete Isomerisierung bei den meisten acyclischen π -Allyl-Pd-Komplexen auftritt, wobei die Lage des Gleichgewichtes von der Grösse des Substituenten am mittleren C-Atom des Allylsystems ¹¹⁸⁾, von der sterischen Hinderung der Substituenten an C-4 und vom Einfluss der restlichen Liganden am Pd auf die Geometrie des Komplexes abhängt ¹²¹⁾.

Die Abhängigkeit des syn-anti-Verhältnisses von Liganden am Pd ist bei den Komplexen 88 ¹²²⁾ und 89 ¹¹⁸⁾ bestimmt worden, s. Schema 37.

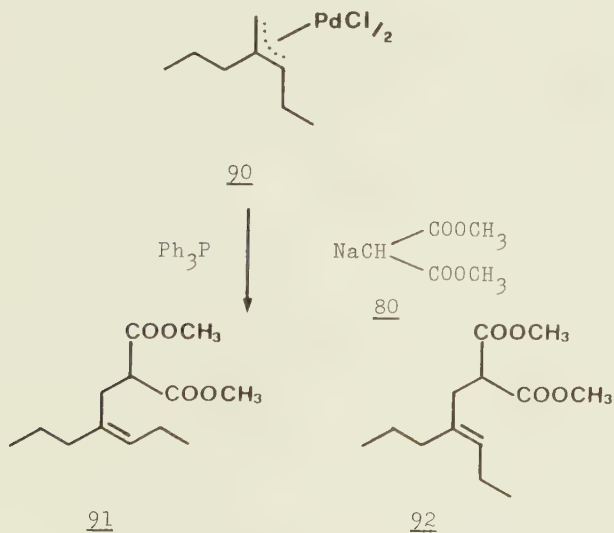
Schema 37



Die Abhängigkeit des Gleichgewichtes der syn-anti-Komplexe von den Liganden am Pd könnte von Bedeutung für die Alkylierung acyclischer π -Allyl-Pd-Komplexe sein, wenn man annimmt, dass die Produktanalyse (E/Z-Verhältnis) der Alkylierung die Gleichgewichtszusammensetzung der π -Allyl-Pd (Cl,L)-Komplexe widerspiegelt. Ein von Trost ¹¹⁶⁾ publiziertes Experiment unterstützt diese Ansicht. So ent-

steht bei der Reaktion des Pd-Komplexes 90 mit Natriumdimethylmalonat 80 in Gegenwart von Ph_3P ein Olefingemisch 91 und 92 Z/E=63:37, s. Schema 38, während in einem vergleichbaren Fall, s. Schema 30, mit DIPHOS "ausschliesslich" das E-Isomere gebildet wird.

Schema 38



3.3. Allyloxydation mit SeO_2

SeO_2 ist eines der verlässlichsten Reagenzien zur stereo- und regioselektiven Oxidation allylischer C-Atome an trisubstituierten Doppelbindungen, wobei die Reaktivität in der Reihenfolge $\text{CH}_2 > \text{CH}_3 > \text{CH}$ abnimmt ^{123,111}).

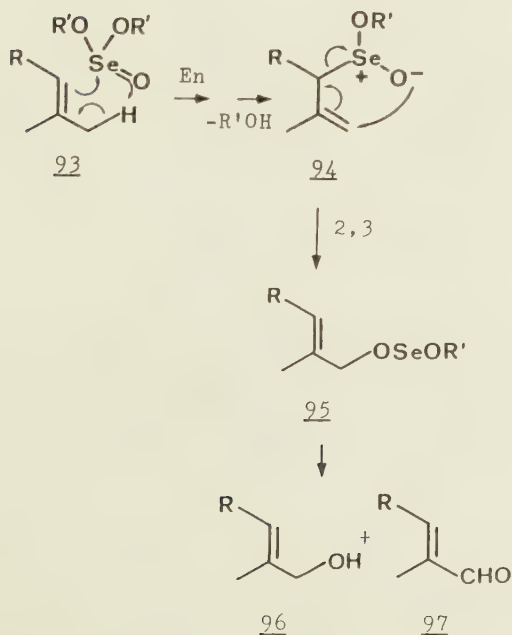
Die thermische Variante - Erhitzen des Olefins 93 in Aethanol in Gegenwart von suspendiertem SeO_2 ^{102, 103, 123}) - liefert in 96% Reinheit eine Mischung des E-Allylalkohols 96 und des E-Aldehyds 97, verläuft aber mit Ausbeuten

$\leq 40\%$, s. Schema 39. Die Bildung von schwer abtrennbarem, roten Selen ist ein weiterer Nachteil dieser Reaktionsbedingungen. Eine wesentliche Verbesserung wurde von Sharpless ¹²⁴) durch die Zugabe von überschüssigem t-Butylhydroperoxid (TBHP) und Salicylsäure erzielt. Die Allyloxydation kann in aprotischen Lösungsmitteln bei Rt. mit 0,5 - 0,02 Moläquivalenten suspendierten Selendioxyds ausgeführt werden; es entsteht kein elementares Selen, da offenbar die als Zwischenprodukte auftretenden Se(II)-Verbindungen aufoxidiert werden. Die Ausbeuten erreichen in einigen Fällen 60%. Nachteilig wirkt sich die Tatsache aus, dass offensichtlich ¹²⁴) kein vollständiger Eduktumsatz möglich ist.

Die allgemein akzeptierte Vorstellung über den Mechanismus der SeO_2 -Oxidation ¹²⁵) geht auf Wiberg und Nielsen ¹²⁶) zurück, die als erste die Bildung eines Zwischenproduktes

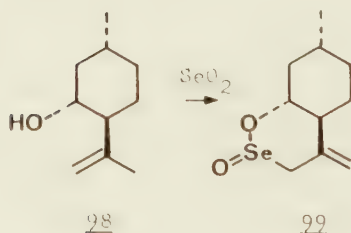
94 mit Se-C- σ -Bindung postulierten, s. Schema 39. Diese Ansicht wurde später durch Experimente von Sharpless ¹²⁷⁾ gestützt, die zeigten, dass Allylseleninsäuren leicht [2,3]-sigmatrope Umlagerungen eingehen. Ein weiteres Indiz für die Mehrstufigkeit der Oxidation ist die Tatsache, dass die Produkte der En-Reaktion, 94, in Form der Seleninolaktone, z.B. 99, s. Schema 40, abgefangen werden können, wenn die [2,3]-Umlagerung aus sterischen Gründen nicht möglich ist ¹²⁸⁾. Diese Experimente können auch als Hinweis auf eine primäre Bildung von Estern oder Halbestern der selenigen Säure bei der SeO₂-Oxidation gedeutet werden.

Schema 39



Demnach wurde die SeO_2 -Oxidation gemäss Schema 39 ¹²⁹⁾ als En-Angriff ¹³⁰⁾ einer nicht weiter definierten >Se-O^+ - Einheit an die Doppelbindung formuliert, gefolgt von H_2O oder R'OH Abspaltung und $[2,3]$ -Umlagerung zum Se(II) -Ester 95, dessen Hydrolyse den E-Allylalkohol 96 und E-Allylaldehyd 97 liefert. Die für das biosynthetische Problem, s. 2.9.3, relevante Fragestellung nach der Stereoselektivität der Allyloxidation war nicht bearbeitet worden.

Schema 40

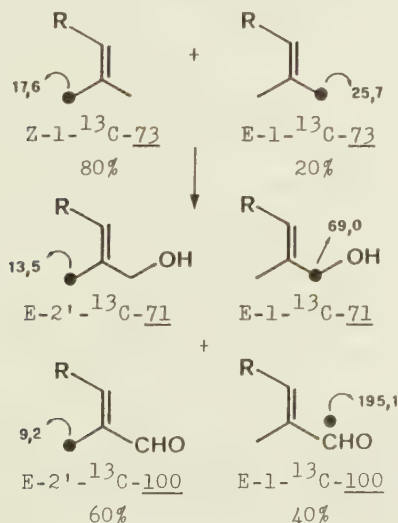


Demzufolge wurde in einem präparativen Ansatz eine 0,2M Lösung des ^{13}C -markierten Olefins 1- ^{13}C -73, bestehend aus den Stereoisotopomeren Z-1- ^{13}C -73/E-1- ^{13}C -73

80:20 in 95% Aethanol nach Zugabe von 0,5 Moläquivalenten SeO_2 90 Min. unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeitung, präp. DC. und Destillation erhielt man mit 10% Ausbeute die konstitutionsisotopomeren Alkohole E-2'- ^{13}C -71 und E-1- ^{13}C -71 (60:40) und die Aldehyde E-2'- ^{13}C -100 und E-1- ^{13}C -100 (60:40).

Die Struktur der isolierten Verbindungen wurde auf Grund der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zugeordnet, s. Schema 41, unter Berücksichtigung von γ -Effekten ¹³¹⁾ und literaturbekannten Daten für Terpene ^{104, 112)}; zur Bestimmung der Verhältnisse der Konstitutionsisotopomeren wurden die ^1H -NMR-Spektren verwendet.

Schema 41



Die Veränderung des Isotopomerenverhältnisses von 80:20 im Edukt auf 60:40 in den Produkten kann folgende Ursachen haben:

1.) säurekatalysierte Isomerisierung der Doppelbindung von 1- ^{13}C -73 unter dem Einfluss von aus SeO_2 gebildeter seleniger Säure bzw. deren Halbester ¹³²);

2.) reversible Protonierung eines Zwischenproduktes der Allyloxidation, z.B. 94, oder

3.) verminderte Stereoselektivität der En-Reaktion.

Zur Unterscheidung zwischen diesen drei Möglichkeiten wurde die Reaktion durch Aufnahme von NMR-Spektren verfolgt.

Zu dem Zweck löste man die stereoisotopomeren Olefine

Z-1- ^{13}C -73 / E-1- ^{13}C -73 80:20 in 95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OD}$ / 5% D_2O

und versetzte zunächst mit 0,1 Moläquivalent SeO_2 . In den während zwei Stunden bei 30° und 70° aufgenommenen ^{13}C -

NMR-Spektren war weder eine Veränderung des Eduktstereoisotopomerenverhältnisses zu beobachten noch eine Produktbildung nachweisbar; d.h. unter dem Einfluss katalytischer

Mengen seleniger Säure bzw. deren Halbester tritt keine signifikante Randomisierung der ^{13}C -Markierung auf. An-

schliessend wurden nach Zugabe von einem Äquivalent SeO_2 bei 72° während 90 Min. 10 rauschentkoppelte ^{13}C -

NMR-Spektren aufgenommen. Die Auswertung der Daten zeigte,

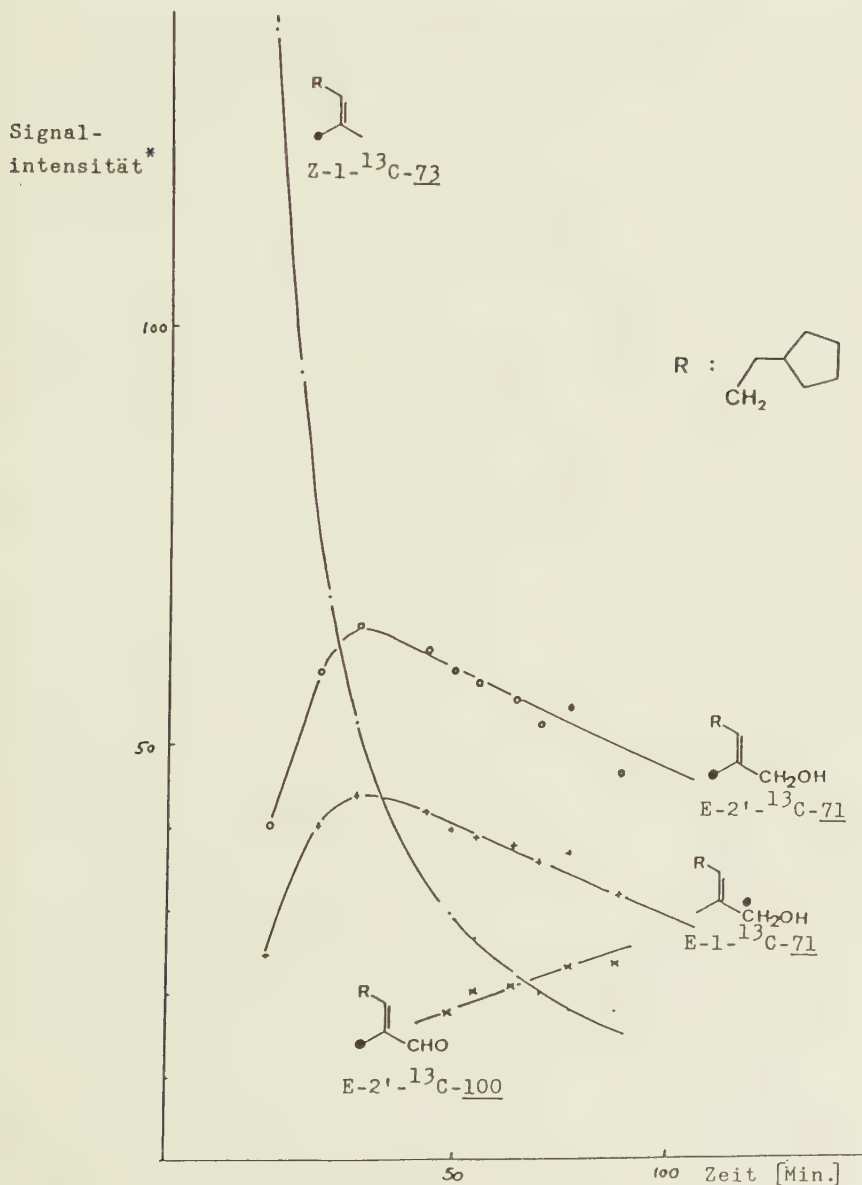
dass das ^{13}C -markierte Olefin 73 mit einer Kinetik zwei-

ter Ordnung während 90 Min. abreagiert, ohne dass sich das

Verhältnis der Stereoisotopomeren von 80:20 ändert. In Abb.6

Abbildung 6

SeO₂-Oxidation von Z-1-¹³C-73 in 95% C₂H₅OD/5% D₂O bei 72°



ist die relative zeitliche Konzentrationsänderung von Z-1-¹³C-73 und von den Produkten E-2'-¹³C-71 und E-1-¹³C-71 und E-2'-¹³C-100 dargestellt. Dabei fällt auf, dass die zuerst auftretenden Produkte, die konstitutionsisotopomeren Alkohole, das gleiche, zeitlich konstante Isotopomerenverhältnis aufweisen, wie man es bei dem präparativen Ansatz an den isolierten Verbindungen bestimmt hatte. Die Aldehydbildung wird erst nach 30 Min. signifikant, gleichzeitig nimmt die Konzentration der Alkohole ab, was als Hinweis angesehen werden kann, dass die Aldehyde nicht durch Oxidation der als Zwischenprodukte vermuteten Se(II)-Ester entstehen, sondern Folgeprodukte der Alkohole sind. Da eine Deuterierung der Oxidationsprodukte nicht nachweisbar war, tritt offenbar keine reversible Protonierung der Doppelbindung von 94 auf.

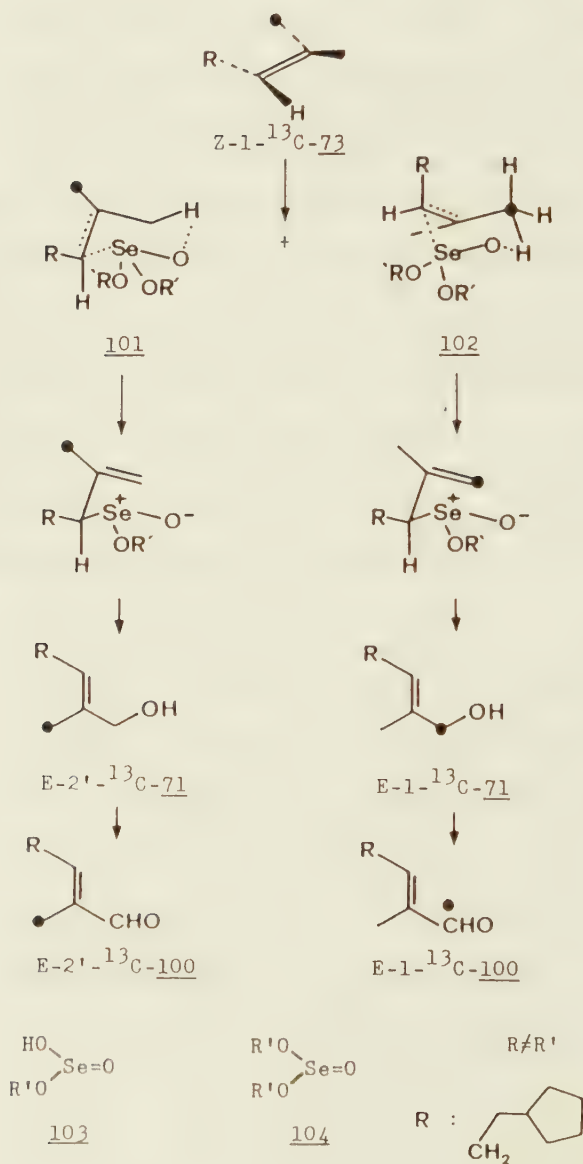
Auf Grund der vorliegenden Resultate ist sichergestellt, dass die SeO₂-Oxidation zwei wesentliche Reaktionsschritte unterschiedlicher Stereoselektivität enthält. Die [2,3]-sigmatrope Umlagerung bestimmt die vom präparativen Standpunkt aus interessante E-Konfiguration (≥96%) der Oxidationsprodukte, während die vorgelagerte, reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende En-Reaktion die Verteilung der ¹³C-Markierung determiniert.

Versucht man die Stereoselektivität der En-Reaktion ^{130, 133, 134)} an Hand der Uebergangszustände 101 und 102 zu erklären, so lässt sich die Veränderung der Isotopomerenverhältnisse von 80:20 in den Edukten auf 60:40 in den Oxidationsprodukten mit der Annahme deuten, dass auf Grund der pseudoäquatorialen Lage des Restes R eine 67:33 Präferenz zugunsten des Uebergangszustandes 101 vorliegt, in dem die E-Methylgruppe in die En-Reaktion involviert ist, s. Schema 42. Da die Uebergangszustände 101 und 102 zweifellos abgeflachte Sesselkonformationen darstellen, ist es schwer abzuschätzen, welche Faktoren die pseudoäquatoriale Lage von R um den kleinen Energieunterschied von ~0,4 kcal/mol begünstigen. In Frage kommen eine 1,3-diaxiale Wechselwirkung für R im Uebergangszustand 102 sowie möglicherweise unterschiedliche Wechselwirkungen von R in 101 und 102 mit den Substituenten am Selen. Diesbezüglich ist man auf Spekulationen angewiesen. In früheren Arbeiten wurde meistens SeO_2 als Enophil diskutiert. Durch die Isolierung von Seleninolaktonen ^{f13)}, z.B. 99, s. Schema 40, durch Vasella, Arigoni & Sharpless ¹²⁸⁾

f13)

Seleninolaktone entstehen auch bei der [2+4]-Cycloaddition von SeO_2 an Diene ^{135, 136)}

Schema 42



und die durch IR-Messungen von Paetzold ¹³²⁾ belegte Tatsache, dass die methanolischen und äthanolischen Lösungen von SeO_2 die Halbester und Ester der selenigen Säure enthalten, wird nahegelegt, dass sowohl 103 als auch 104 als Enophile in Frage kommen, deren Substituenten durch Wechselwirkung mit dem Olefin die Energiedifferenz der Uebergangszustände 101 und 102 beeinflussen können ^{f14)}.

Da wir keine Möglichkeit sahen, über eine Modifizierung des biosynthetisierten Farnesols Einfluss auf die Energiedifferenz von 101 und 102 zu nehmen, entschloss man sich zu der im folgenden beschriebenen Untersuchung mit dem Ziel, Ester der selenigen Säure auf möglichst einfache Weise darzustellen, ihre Fähigkeit zur Allyloxidation zu überprüfen und gegebenenfalls die En-Stereoselektivität zu bestimmen.

f14)

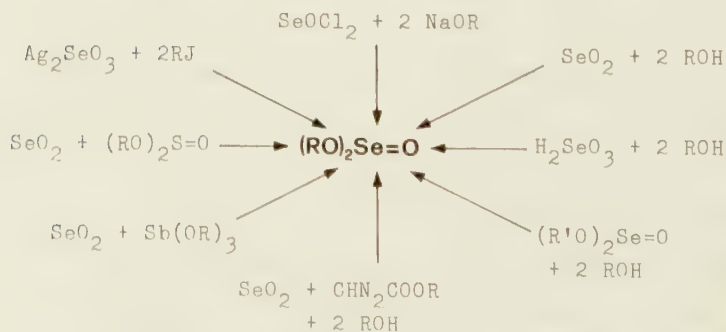
Stephenson und Speth ¹¹¹⁾ untersuchten die Lösungsmittelabhängigkeit der SeO_2 -Oxidation (+OH versus +OH/Pyridin) von E- und Z-(R)-4-²H₁-3-Methyl-2-penten. Demnach scheint die En-Reaktion in t-Butanol nicht konzertiert, sondern über Carbeniumionenzwischenprodukte zu verlaufen; in Gegenwart von Pyridin wird dieser Reaktionsweg unterdrückt. Auf Grund eines unzulässigen Vergleiches eines intra- mit einem intermolekularen Isotopieeffekt beurteilen die Autoren die En-Reaktion als nicht selektiv.

3.4. Darstellung und spektroskopische Eigenschaften von Estern der selenigen Säure

3.4.1. Einleitung

Die in der Literatur beschriebenen Darstellungsmöglichkeiten für Ester der selenigen Säure sind in Schema 43 zusammengefasst ^{137, 138}). Die spektroskopische Charakterisierung der acyclischen Verbindungen beschränkt sich auf den Nachweis der Se=O Streckschwingung im IR-Spektrum ^{132, 140}). Die Struktur der fünfgliedrigen, cyclischen Selenite wird nach Elektronenbeugungs- und Dipolmessungen von Arbuzov am besten durch einen ausgeflachten Fünfring beschrieben ^{141, 142, 143}), s. Schema 45.

Schema 43



R : $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}-$
 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

n : 0, 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15.

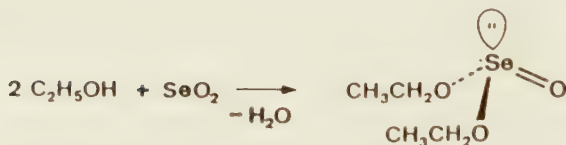
3.4.2. Diäthylselenit (105)

In der durch die Arbeiten von Paetzold ¹³²⁾ gestützten Annahme, dass sich SeO_2 spontan mit Alkoholen unter Bildung von Estern und Halbestern der selenigen Säure umgesetzt und in Anlehnung an die Reaktionsbedingungen der SeO_2 -Oxidation in Aethanol wurde zunächst versucht, Diäthylselenit (105) durch Umsetzung von SeO_2 in siedendem Aethanol in Gegenwart von $3\text{\AA}$ Molekularsieb darzustellen. Man erhielt nach 4-16 stündigem Erhitzen, anschliessender Filtration unter Argon und Destillation bei $80^\circ/15$ Torr in Ausbeuten von 35-42% eine farblose Flüssigkeit von leicht stechendem, süsslichen Geruch, die an Hand des IR-Spektrums mit einer charakteristischen Absorption $\nu_{\text{Se=O}} = 935 \text{ cm}^{-1}$ in Uebereinstimmung mit Angaben von Paetzold ^{132, 140)} als Diäthylselenit (105) identifiziert wurde.

Eine wesentliche Vereinfachung und Ausbeutensteigerung auf 75% brachte die folgende Methode. SeO_2 wurde in einer 1M Lösung von Aethanol in CHCl_3 suspendiert und die Mischung bei 35° in einem Ultraschallbad (Sonorex, 35 kHz/120 Watt) während 30 Min. behandelt. Während dieser Zeit löste sich das SeO_2 auf, und es entstand eine leichte Trübung durch das gebildete Wasser. Anschliessend fügte man $3\text{\AA}$ Molekularsieb hinzu, liess 2 Std. bei 25° stehen, filtrierte und destillierte. Auf diese Weise erhielt man spektroskopisch reines 105.

Im ^{13}C -NMR Spektrum von Diäthylselenit (105) beobachtet man zwei charakteristische Resonanzen bei 57,6 ppm für die CH_2 -Gruppen und bei 16,1 ppm für die Methylgruppen. Im ^1H -NMR erkennt man ein Triplett für zwei Methylgruppen bei 1,32 ppm ($J=7,1$ Hz) und für die Methylengruppen ein im 400 MHz-Spektrum völlig aufgelöstes 16 Linien Multiplett mit Zentrum bei 4,07 ppm, das bei Einstrahlung in die Methylgruppen zu einem AB-System mit $J=11,0$ Hz vereinfacht wird. Dieses Resultat identifiziert das Se als prochirales Zentrum mit pyramidaler Konfiguration ^{f15)}, s. Schema 44.

Schema 44



105

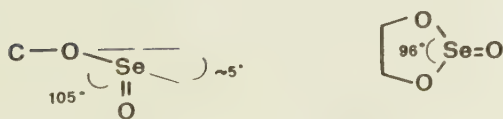
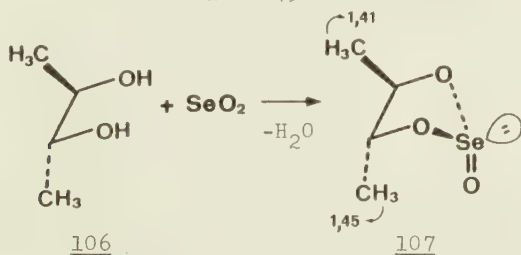
f15)

Bezüglich der Konfiguration vierwertiger Selenverbindungen vom Typ SeX_3E (E =freies Elektronenpaar), vgl. ¹⁴⁴⁾.

3.4.3. (4R,5R)-4,5-Dimethyl-1,3,2-dioxaselenolan-2-oxid (107)

Durch Auflösen einer äquimolaren Menge SeO_2 in einer 0,25 M Lösung von (2R,3R)-Butandiol (106) in CHCl_3 im Ultraschallbad während 50 Min. erhielt man eine trübe Lösung des cyclischen Selenits 107, die anschliessend durch Stehenlassen über $3\text{\AA}$ Molekularsieb während zwei Stunden entwässert wurde. Nach Filtration unter Argon und Destillation bei $55^\circ/10^{-2}$ Torr erhielt man mit einer Ausbeute von 92% ein farbloses Öl vom Drehwert $[\alpha]_D^{25} = -37,9^\circ$ ($c=22,5$ in CHCl_3), dessen IR-Spektrum eine charakteristische Frequenz $\nu_{\text{Se=O}}=945\text{ cm}^{-1}$ aufweist. Das ^{13}C -NMR-Spektrum von 107 ist gekennzeichnet durch zwei Signale für die tertiären C-Atome bei 85,7 ppm und 82,5 ppm sowie zwei Resonanzen für die Methylgruppen bei 17,6 und 16,3 ppm.

Schema 45



Nach Angaben von Arbuzov (141)

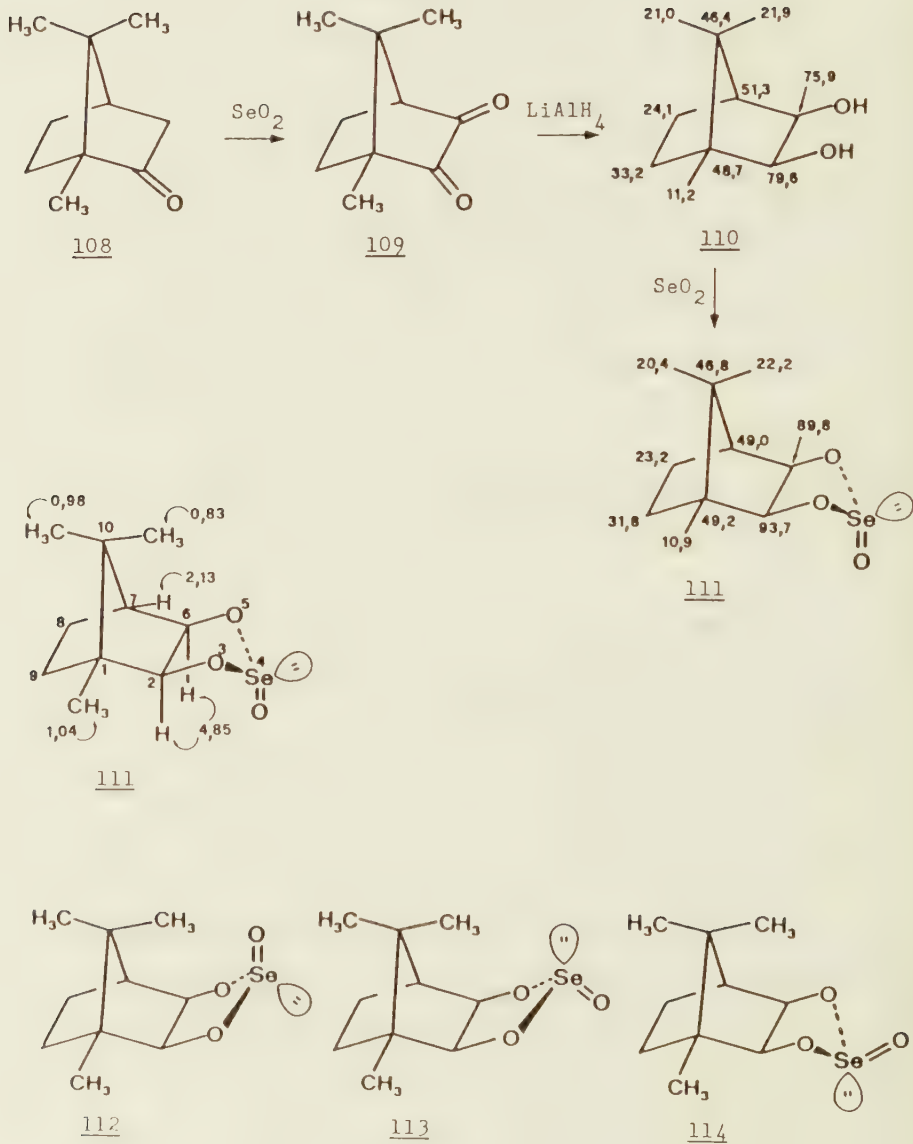
Im ^1H -NMR-Spektrum von 107 beobachtet man für die Methinprotonen ein 16 Linien Multiplett mit Zentrum bei 4,25 ppm, das bei Einstrahlung in die Methylgruppen zu einem AB-System mit $J=9,2$ Hz vereinfacht wird. Die Methylgruppen absorbieren in Form zweier Dubletts ($J=6,0$ Hz) bei 1,45 und 1,41 ppm. Die Zuordnung, s. Schema 45, erfolgte in Analogie zu strukturverwandten cyclischen Sulfiten, die von Lauterbur ¹⁴⁵⁾ und Haake ¹⁴⁶⁾ untersucht wurden. Auch in diesem Fall sprechen alle NMR-Daten für eine pyramidale Konfiguration am Se in Uebereinstimmung mit der Elektronenbeugungsanalyse von Arbuzov ¹⁴¹⁾.

3.4.4. 1,10,10-Trimethyl-3,5-dioxa-4-selena-tricyclo-
[5,2,1,0^{2,6}] decan-4-on (111)

In Gegenwart eines 6,6 molaren Ueberschusses an SeO_2 wurde (+)-Campher (108) 25 Std. in Acetanhydrid unter Rückfluss erhitzt ¹⁴⁷⁾ und nach Aufarbeitung und Kristallisation GC-reines (-)-Campherchinon (109), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +105,7^\circ$ mit einer Ausbeute von 89% erhalten. Anschliessende Reduktion mit LiAlH_4 in Aether lieferte nach einer modifizierten Vorschrift von Angyal ¹⁴⁸⁾ mit 77% GC-reines exo-2,3-Bornandiol (110). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12,2^\circ (c=3,19, \text{CHCl}_3)$, dessen ^1H -NMR-Spektrum ein für die exo-Konfiguration charakteristisches AB-System bei 3,64 ppm ($J=6,5$ Hz) für die beiden vicinalen H an C-2 und C-3 zeigte. Zur Interpreta-

tion der ^{13}C -NMR-Spektren von 110, s. Schema 46, wurden die Arbeiten von Schneider¹⁴⁹⁾ über ^{13}C -NMR von Norbornylalkoholen, von Voelter¹⁵⁰⁾ über Polyole sowie das auf der Basis der ^{13}C -NMR-Spektren von Borneol¹⁵¹⁾ und Isoborneol¹¹²⁾ berechneten Spektrums (INKA-ONLINE-Service, Karlsruhe, BRD) für 110 herangezogen. Gab man zu einer Lösung von 110 in CHCl_3 eine äquimolare Menge SeO_2 , so erhielt man nach 30 Min. Behandlung im Ultraschallbad eine leicht trübe Lösung, die nach Entfernung des Wassers mit $3\text{\AA}$ Molekularsieb, Filtration und 14 Std. Trocknen bei 10^{-2} Torr in einer Ausbeute von 95% das cyclische Selenit 111 in Form farbloser Kristalle vom Smp.: $95,0-96,6^\circ$, $[\alpha]_D^{22^\circ} = -5,13^\circ$ ($c=10,0$, CHCl_3) ergab. Die Verbindung ist charakterisiert durch eine typische IR-Absorption $\nu_{\text{Se=O}}=935\text{ cm}^{-1}$, sowie mit Hilfe der off-resonance und rauschentkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren, die durch Vergleich mit den entsprechenden Spektren von 110 eine Zuordnung der Resonanzfrequenzen erlauben, s. Schema 46. Das ^1H -NMR-Spektrum des Selenits 111 unterscheidet sich von dem des Diols 110 durch das Fehlen der Resonanz für die beiden OH-Protonen bei 2,82 ppm, durch eine Tieffeldverschiebung des Brückenkopfprotons nach 2,13 ppm (H an C-7, d, $J=4,0$ Hz mit exo-H an C-8) und eine drastische Tieffeldverschiebung um 1,21 ppm für das AB-System der endständigen, vicinalen Protonen nach 4,85 ppm.

Schema 46



Für das tricyclische Selenit sind vier Strukturen denkbar, s. Schema 46. Dreiding-Modelle der Invertomeren 112 und 113 zeigen eine ausgeprägte sterische Wechselwirkung der Methylgruppe an C-10 mit dem Sauerstoff der Se=O Bindung bzw. dem freien Elektronenpaar, da aber keine der Methylgruppen des Terpengerüstes eine adäquate Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum relativ zum Diol 110 aufweist, halten wir diese Strukturen für unwahrscheinlich.

Die Invertomeren 111 und 114 sind offenbar durch eine hohe Energiebarriere getrennt, vgl. 3.4.7. Da es sich um Diastereoisomere handelt, müssten, falls ein Gemisch vorliegt, zwei Sets von Signalen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zu beobachten sein; das ist nicht der Fall. Die bemerkenswerte Tieffeldverschiebung der Protonen an C-2 und C-6 relativ zum Diol 110 und die stereoelektronisch begünstigte pseudoäquatoriale Position des freien Elektronenpaares am Se ¹⁴⁴) in 111 sprechen gegen die Struktur 114.

Wir ordnen deshalb dem tricyclischen Selenit die Struktur 111 mit der absoluten Konfiguration S am Selen zu; unseres Wissens handelt es sich um die erste konfigurationsstabile, chirale Organoselenverbindung.

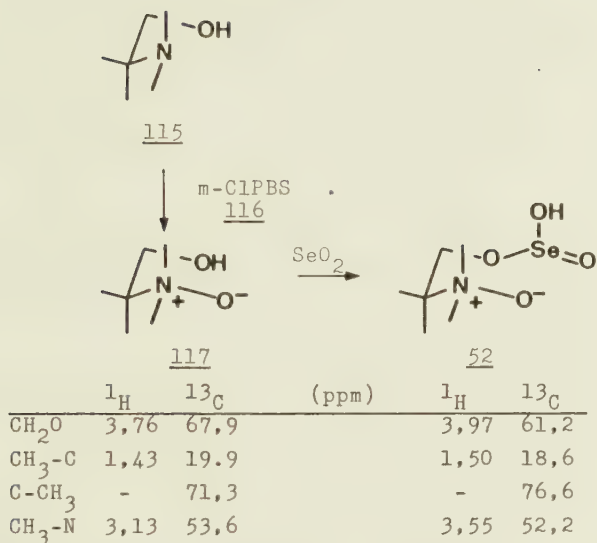
3.4.5. 2-N,N-Dimethyl-N-oxido-2-methyl-propoxy-
seleninsäure (52)

Zu einer Lösung von 2-N,N-Dimethyl-2-methyl-1-propanol (115) in CH_2Cl_2 wurde bei 0° ein 1,2 molarer Ueberschuss an m-Chlorperbenzoesäure (116) portionsweise hinzugefügt und anschliessend 2 Std. bei 25° gerührt. Gemäss DC-Kontrolle war der Eduktumsatz vollständig und man isolierte anschliessend das N-oxid 117 durch Gradient-SC ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 10-30%) als kristalline, hygroskopische Verbindung vom Smp.: $35,2-36,5^\circ$ in einer Ausbeute von 89%.

117 ist charakterisiert durch die im Schema 47 angegebenen Resonanzen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

Eine 1M Lösung des N-oxids 117 in $\text{CHCl}_3/20\%$ DMSO wurde bei 40° mit einem Äquivalent SeO_2 während 90 Min. im Ultraschallbad umgesetzt und nach Entfernung des Lösungsmittels der Rückstand 24 Std. bei 10^{-3} Torr getrocknet. Man erhielt 52 mit einer Ausbeute von 96% als leicht gelbliche, sternchenförmige Kristalle, die extrem hygroskopisch waren und nach Elementaranalyse und den im Schema 47 angegebenen Spektraldaten eindeutig als Halbester der selenigen Säure identifiziert wurden.

Schema 47



3.4.6. ⁷⁷Se-NMR-Spektroskopie von Estern der selenigen Säure

Von den sechs natürlich vorkommenden Isotopen des Selen besitzt nur der Kern ⁷⁷Se ein magnetisches Moment, der Spin beträgt I=1/2, die natürliche Häufigkeit 7,58% und die Nachweisempfindlichkeit relativ zum Proton 5,2 x 10⁻⁴ (52). Deshalb ist erst in den letzten 10 Jahren mit fortschreiten- der Entwicklung der hochauflösenden FT-NMR-Geräte die ⁷⁷Se-NMR-Spektroskopie zunehmend zur Charakterisierung selenorganischer Verbindungen herangezogen worden. Dabei richtete sich das Interesse hauptsächlich auf die chemische Verschiebung der ⁷⁷Se-Resonanz relativ zu dem üblicher-

weise als Standard verwendeten Dimethylselenid. Eine zusammenfassende Darstellung der bis 1978 erhobenen Daten stammt von McFarlane ¹⁵³⁾, f16). Daraus wird ersichtlich, dass die chemische Verschiebung des ⁷⁷Se-Kerns in einem >2000 ppm ¹⁵⁴⁾ umfassenden Bereich im wesentlichen vom Oxidationszustand des Selen und der Elektronegativität seiner Substituenten bestimmt wird. Mit steigender Elektronegativität resultiert eine zunehmende Tieffeldverschiebung relativ zu $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, wobei die grössten Werte bei Selenverbindungen mit freiem Elektronenpaar und mehreren elektronegativen Liganden auftreten; z.B. $\text{X}_2\text{Se}=\text{O}$, X: F, Cl. Von den Estern der selenigen Säure ist nur das Dimethylselenit mit einer ⁷⁷Se-Resonanz bei 1339 ppm (ohne Lösungsmittel) gemessen worden ¹⁶⁰⁾.

f16)

Seitdem sind zahlreiche Publikationen erschienen, in denen die Bedeutung der Kopplungskonstanten von ⁷⁷Se zu ¹H ¹⁵⁵⁾, ¹³C ^{156, 157)}, ³¹P ¹⁵⁸⁾ und ⁷⁷Se ¹⁵⁹⁾ für die Strukturanalyse selenorganischer Verbindungen zum Ausdruck kommt.

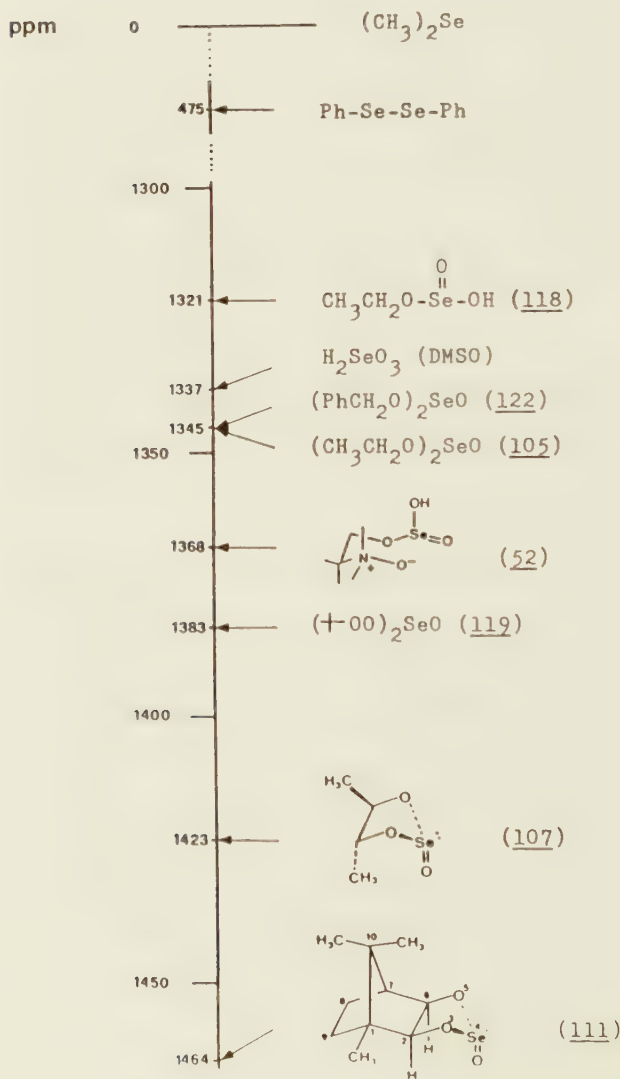
Es war in diesem Zusammenhang interessant, die ^{77}Se -NMR-Spektren der von uns dargestellten Selenite aufzunehmen und damit die Informationslücke in diesem Bereich zu schliessen. Die in Abbildung 7 wiedergegebenen Daten wurden sämtlich bei 38,164 MHz auf dem Varian XL200 gemessen, wobei jeweils 1-2M Lösungen der Ester in CDCl_3 verwendet wurden (wenn nicht anders angegeben). Als externer Standard wurde Diphenyldiselenid, Ph-Se-Se-Ph , verwendet, dessen Tieffeldverschiebung relativ zu $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ in CDCl_3 kürzlich¹⁵⁴⁾ zu 475 ppm bestimmt wurde. Auf Grund dieser Relation sind alle Verschiebungen umgerechnet und auf $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ bezogen. Es ist ersichtlich, dass die ^{77}Se -Resonanzen der acyclischen Selenite im Bereich von 1345-1383 ppm auftreten, während die der cyclischen Verbindungen bis zu 100 ppm nach tieferem Feld in den Bereich der Selenylhalogenide, $\text{X}_2\text{Se=O}$, verschoben sind.

Wegen der starken Abhängigkeit der ^{77}Se -Resonanz von strukturellen und elektronischen Parametern eignet sich die ^{77}Se -NMR-Spektroskopie besonders zur Untersuchung von Mischungen solcher Organoselenverbindungen, die mit Hilfe der ^1H - oder ^{13}C -NMR-Spektroskopie schwer erfassbar sind.

Als Beispiel sei die Analyse der äthanolischen Lösungen von H_2SeO_3 und SeO_2 angeführt. Im ^{77}Se -NMR-Spektrum einer Lösung von H_2SeO_3 /Äthanol 1:2 in CDCl_3 beobachtet man drei Resonanzen mit in der Reihe zunehmender Linien-

Abbildung 7

^{77}Se -Resonanzen von Estern der selenigen Säure (CDCl_3)



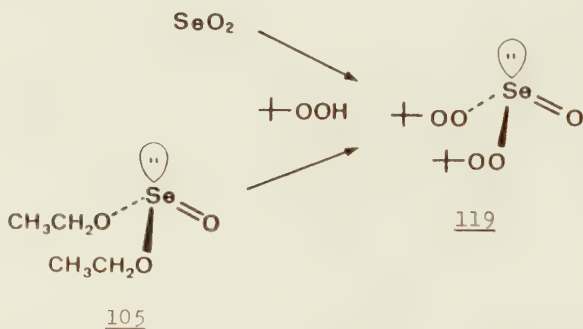
breite bei 1344 ppm für $(C_2H_5O)_2SeO$ (105), bei 1321 ppm für $C_2H_5O-Se(O)OH$ (118) und bei 1315 ppm für H_2SeO_3 . Die Zuordnung wird ermöglicht durch die Befunde, dass eine Lösung von SeO_2 /Aethanol 1:2 in $CDCl_3$ zwei Resonanzen bei 1323 ppm und 1344 ppm für den Halbester 118 bzw. Diäthylselenit (105) zeigt, während H_2SeO_3 in DMSO ein Signal bei 1337 ppm (in H_2O bei 1282 ppm¹⁵³) ergibt.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel befasst sich mit der Frage nach der reaktiven Spezies in der durch t-Butylhydroperoxid „katalysierten“ SeO_2 -Oxidation. Sharpless^{124, 161}) sieht die Bedeutung des TBHP einzig darin, die bei der Oxidation auftretenden Se(II)-Spezies wieder aufzuoxidieren und dadurch einen „katalytischen“ Kreislauf zu ermöglichen. Auf Grund unserer Beobachtungen, dass die Selenite in Gegenwart von TBHP bei 25° um mindestens den Faktor 10 schneller mit trisubstituierten Olefinen reagieren als ohne TBHP und bei Zugabe von TBHP zu einer NMR-Probe von Diäthylselenit (105) im 1H -NMR-Spektrum momentan die Resonanzen von Aethanol auftreten, vermuten wir als reaktive Verbindung der Allyloxidation unter Sharpless-Bedingungen¹²⁴) das t-Butylperoxiselenit 119, s. Schema 48.

Es ist zwar nicht möglich gewesen, diese Verbindung lösungsmittelfrei darzustellen, aber die folgenden Hinweise unterstützen unsere Annahme. Eine Lösung von SeO_2 /TBHP 1:2 in $CDCl_3$ /20% DMSO zeigte nach 8 Stunden Trocknen über 3Å Molekularsieb und Filtration durch Watte

unter Argon im ^{77}Se -NMR-Spektrum eine Resonanz bei 1383 ppm. Fügt man zu einer Lösung von Diäthylselenit (105) in CDCl_3 zwei Äquivalente TBHP hinzu, so beobachtet man im ^{77}Se -NMR-Spektrum ein Signal bei 1344 ppm für 105 und ein zusätzliches bei 1387 ppm, das wir dem $(\text{+OO})_2\text{Se=O}$ (119) zuordnen f17).

Schema 48



f17)

Haruna ¹⁶²⁾ formulierte +OO-Se(O)-OH als reaktive Verbindung bei der Allyloxydation von Germacranoliden mit $\text{SeO}_2/\text{+OOH}$ in CH_2Cl_2 .

3.4.7. Pyramidale Inversion am Se in Verbindungen vom Strukturtyp SeX_3E

Die spektroskopischen Eigenschaften der von uns dargestellten Selenite, vgl. 3.4.2 -3.4.5 beweisen eine pyramidale Konfiguration am Selen. Diese strukturelle Eigenschaft haben die Selenite gemeinsam mit allen Verbindungen des Typs SeX_3E .¹⁴⁴⁾ (E: freies Elektronenpaar) und den entsprechenden Schwefelverbindungen^{145, 146, 163)}.

Im Gegensatz zu den sauerstoffhaltigen Schwefelverbindungen, z.B. den Sulfoxiden, deren Enantiomere leicht zugänglich^{164, 165)} sind und als chirale Hilfsstoffe eingesetzt werden können¹⁶⁶⁾, da sie bei 25° nicht infolge pyramidaler Inversion racemisieren^{167, 168)}, ist die Aktivierungsenergie der Inversion bei den Selenoxiden offensichtlich wesentlich niedriger. Bei 25° liegt die Lebensdauer der Invertomeren in der Größenordnung von 4 sec, wie aus der Koaleszenztemperatur von 110° für das AB-System des Benzyl-phenylselenoxids (120) von Oki¹⁶⁹⁾ abgeschätzt wurde. Für das anomale Verhalten der Selenoxide sind drei Gründe diskutiert worden:

- 1.) Durch die teilweise ausgeprägte Empfindlichkeit gegen Spuren von Wasser verläuft die Racemisierung am Se über ein Hydrat des Selenoxids¹⁷⁰⁾,
- 2.) bei 25° tritt bei Anwesenheit von β -ständigen Wasserstoffatomen syn-Eliminierung unter Ausbildung von

Doppelbindungen ein ^{171, 172)},

3.) im Fall von Allylselenoxiden tritt bereits unterhalb 0° eine rasche [2,3]-sigmatrope Umlagerung unter Bildung von Allylalkoholen ein ^{127, 173)}.

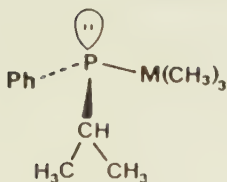
Bei genügender chemischer Stabilität sollten diese Probleme bei den Estern der selenigen Säure nicht auftreten und die Darstellung konfigurationsstabiler Verbindungen möglich sein; denn die Einführung des elektronegativen Substituenten Sauerstoff sollte auf Grund des induktiven Effektes zu einer Verstärkung des s-Charakters des freien Elektronenpaares am Selen und damit zu einer Erhöhung der Inversionsbarriere führen ^{f18)}.

Diese Argumentation wird u.a. experimentell gestützt durch die Arbeiten von Mislow, in denen gezeigt wurde, dass bei den Phosphinen 121 eine lineare Abhängigkeit zwischen der Aktivierungsenergie der Inversion und der Elektronegativität eines direkt am Phosphor gebundenen Substituenten besteht ¹⁷⁵⁾, s. Schema 49.

f18)

Für eine ausführliche Diskussion der Effekte, die die Aktivierungsenergie der pyramidalen Inversion beeinflussen können, vgl. Lambert ¹⁷⁴⁾.

Schema 49



M: C, Si, Ge, Sn

121

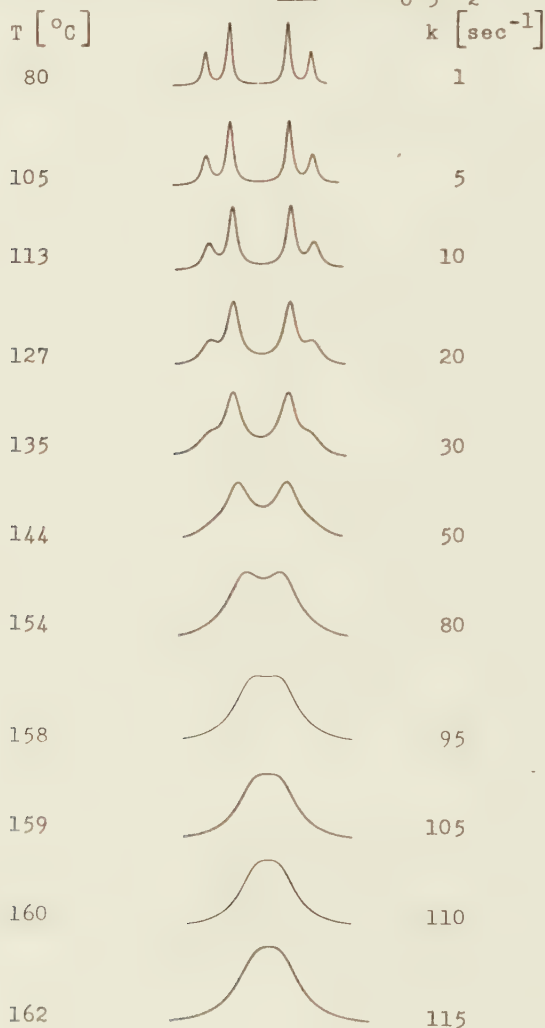
Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der pyramidalen Inversion bei acyclischen Seleniten wurde, um einen Vergleich mit dem von Oki ¹⁶⁹⁾ verwendeten Benzylphenylselenoxid 120 zu ermöglichen, der Dibenzylester der selenigen Säure 122 in Analogie zu 105 dargestellt, vgl. 3.4.2. Im ¹H-NMR-Spektrum von 122 in C₆D₅NO₂ tritt ein Singulett für die aromatischen Protonen bei 7,36 ppm auf, das als interner Standard für die Linienverbreiterung verwendet wurde sowie ein AB-System mit Zentrum bei 5,12 ppm für die Protonen der CH₂-Gruppen. Die Temperaturabhängigkeit der Signalform dieses AB-Systems wurde an einer 0,2M Lösung von 122 in C₆D₅NO₂ durch Aufnahme von 12 ¹H-NMR-Spektren zwischen 22° und 153° gemessen. Zur Computersimulation dieser Spektren mit dem DNMR-3 Programm von G. Binsch ^{f19)} wurde das Spektrum bei 80°, k:1 sec⁻¹, J:12,5 Hz, Δν:42,0 Hz verwendet und eine Koaleszenztemperatur von 160°, k: 110 sec⁻¹ ermittelt, s. Abb. 8.

f19)

Die Computersimulation wurde von U. Piantini ausgeführt.

Abbildung 8

Computersimulierte Signalform des AB-Systems der CH_2 -Gruppen von Dibenzylselenit (122) in $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$

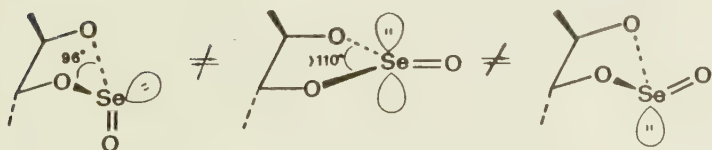


Daraus ergibt sich nach Eyring eine Aktivierungsenergie von $\Delta G^\ddagger_{160^\circ} = 21,6$ kcal/mol. Ferner lässt sich graphisch die mittlere Lebensdauer eines Invertomeren bei 20° zu 200 sec bestimmen (176,177).

Es zeigt sich also, dass die Koaleszenztemperatur für 122 um 50° höher ist als die des Benzylphenylselenoxids 120 (169) und die mittlere Lebensdauer der invertomeren Selenite das Fünffzigfache der entsprechenden Selenoxide beträgt.

Eine weitere Erhöhung der Inversionsbarriere sollte dann auftreten, wenn zusätzlich zum elektronischen Einfluss der Sauerstoffatome eine gegenüber dem pyramidalen Grundzustand grössere Ringspannung im planaren Uebergangszustand der Inversion auftritt, s. Schema 50. Unter Ausnützung beider Effekte war es z.B. Felix und Eschenmoser (178) gelungen, die diastereoisomeren 7-Chlor-7-azabicyclo-[4.1.0] heptane zu isolieren.

Schema 50



Für eine solche Untersuchung bei cyclischen Seleniten eignet sich das leicht zugängliche (4R,5R)-4,5-Dimethyl-1,3,2.-dioxaselenolan-2-oxid (107), s. 3.4.3, dessen ^{13}C -NMR-Spektrum in DMSO Resonanzen bei 83,6 ppm, 80,9 ppm ($\text{CH}-\text{CH}_3$) und 17,2 ppm, 15,9 ppm ($\text{CH}-\text{CH}_3$) aufweist. Von einer 1M Lösung des Selenits 107 in DMSO wurden acht ^{13}C -NMR-Spektren zwischen 14° und 160° aufgenommen. In diesem Temperaturintervall stellte man keine Linienverbreiterung fest, so dass die Koaleszenztemperatur deutlich über 200° liegen dürfte ($\Delta G^\ddagger \approx 26 \text{ kcal/mol}$) und die Invertomeren cyclischer, fünfgliedriger Selenite konfigurationsstabil, d.h. bei Raumtemperatur isolierbar sein sollten.

Dieser Befund ist wichtig in Zusammenhang mit der Darstellung von chiralen Selenverbindungen, s. 3.4.4.

3.4.3. Allyloxidation mit Estern der selenigen Säure

Zur Evaluation der Reaktivität der in 3.4.2 -3.4.5 beschriebenen Ester der selenigen Säure in Bezug auf die für das biosynthetische Problem relevanten Oxidation terminaler Dimethylallylgruppen wurde (-)-Linalylacetat 123 als Standard gewählt. 123 war in einer GC-Reinheit von 96% zugänglich ^{f20)} und sowohl analytisch (GC) als auch

f20)

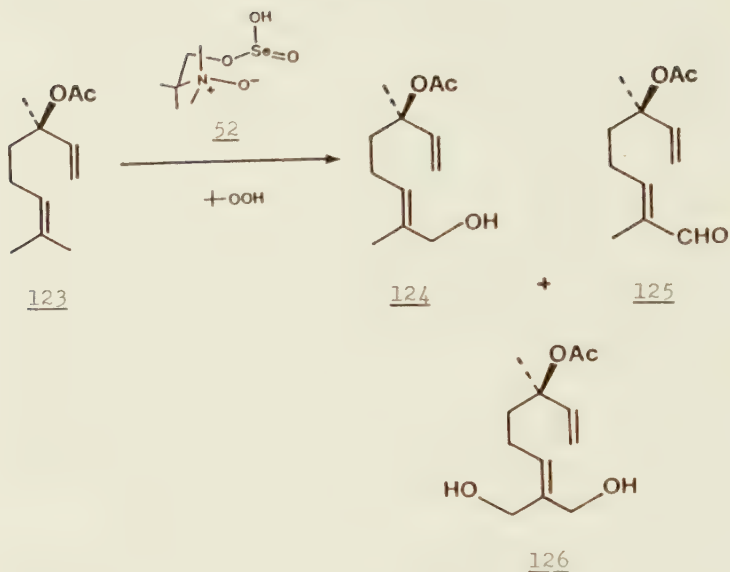
123 wurde durch Vermittlung von Prof. A. Vasella von der Givaudan AG, Dübendorf, zur Verfügung gestellt.

präparativ (DC, SC, Destillation) leicht von den Oxidationsprodukten 124 und 125 abtrennbar. Da sich die Verwendung von t-Butylhydroperoxid (TBHP) bei der SeO_2 -Oxidation als zusätzliches Oxidationsmittel bewährt hatte (161, 162), sollte dieses Reagenz auch hier benutzt werden, wobei zunächst die Stabilität der Selenite in Anwesenheit von TBHP zu überprüfen war.

Bei Oxidationsversuchen in CDCl_3 zeigte sich unter ^1H -NMR-Kontrolle, dass Diäthylselenit (105) in Gegenwart von TBHP umgeestert wird, vgl. auch 3.4.6, während die Ester 107, 111 und 52 nicht nucleophil angegriffen wurden. Letztere wurden demzufolge zur Optimierung präparativer Oxidationsansätze (0,3-10 mmol) verwendet.

Zu einer 0,25M CHCl_3 -Lösung von Linalylacetat (123) und Selenit im Verhältnis 1:1 wurde bei 25° unter Argon ein 4 molarer Ueberschuss an TBHP injiziert. Im Fall der cyclischen Ester 107 und 111 wurde gemäss DC-Kontrolle nach 48 Std./ 25° vollständiger Eduktumsatz festgestellt, und man isolierte nach SC. an Al_2O_3 (bas. Akt.I, Woelm) und Destillation bei $98^\circ/0,01$ Torr eine Mischung des E-Alkohols 124 und E-Aldehyds 125 (77:23 gemäss GC, Reinheit 96 %) in einer Gesamtausbeute von 75%. Der Halbester 52 reagierte auf Grund der intramolekularen Säurekatalyse erwartungsgemäss (130) schneller, man erhielt die gleiche Ausbeute an 124 und 125 bereits nach 24 Std., s. Schema 51.

Schema 51



Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Verminderung der Konzentration des Selenits 52 auf 0,2 Moläquivalente möglich ist, ohne dass sich die Ausbeute an Oxidationsprodukten ändert.

Vergleicht man diese Resultate mit den Experimenten von Sharpless ¹²⁴⁾, so ist der Fortschritt offensichtlich: es wird hier erstmals bei der Oxidation einer Dimethylallylsubstruktur vollständiger Eduktumsatz und gleichzeitig eine reproduzierbare Ausbeutensteigerung um 20% erreicht.

Zur Weiterentwicklung unserer Reaktionsbedingungen trug die Beobachtung bei, dass als einziges Nebenprodukt das

Diol 126 in einer Ausbeute von 20% gebildet wurde. Unter der Annahme, dass das Olefin 123 und der gebildete Allylalkohol 124 kompetitiv mit dem Selenit 52 reagierten, schien es vernünftig, ein Oxidationsmittel zu suchen, das den Alkohol 124 rasch zum Allylaldehyd 125 aufoxidiert. Als Mittel der Wahl erwies sich 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-benzochinon (DDQ) (53) ¹⁷⁹⁾, das, wie im folgenden beschrieben, ausserordentlich effizient den Verlauf der Allyloxydation beeinflusst.

Zu einer 0,25M Lösung des Selenits 52 und Linalylacetat (123) in CHCl_3 /20% DMSO wurde ein Äquivalent DDQ 53 hinzugefügt; daraufhin färbte sich die vorher farblose Lösung tiefrot, und es trat eine leichte Erwärmung ein. Gemäss DC-Kontrolle wurde nach 15 Min. vollständiger Eduktumsatz festgestellt, und die Produkte 124 und 125 nach SC an Kieselgel (Pentan) und Destillation in einer Gesamtausbeute von 93% isoliert. Das Verhältnis der Oxidationsprodukte 124/125 variiert je nach Reaktionsdauer (inclusive Aufarbeitung) zwischen 6:4 (15 Min.) und 1:9 (30 Min.). Die um den Faktor ~100 grössere Reaktionsgeschwindigkeit relativ zu der durch TBHP "katalysierten" Reaktion lässt sich mit einer Charge-transfer Wechselwirkung zwischen DDQ 53 und dem Halbester 52 deuten, die zu einer beachtlichen Polarisierung der Se=O Bindung führt und damit zu einer gegenüber Doppelbindungen erhöhten Reaktivität. Gleichzeitig wird die Bildung des Nebenproduktes 126

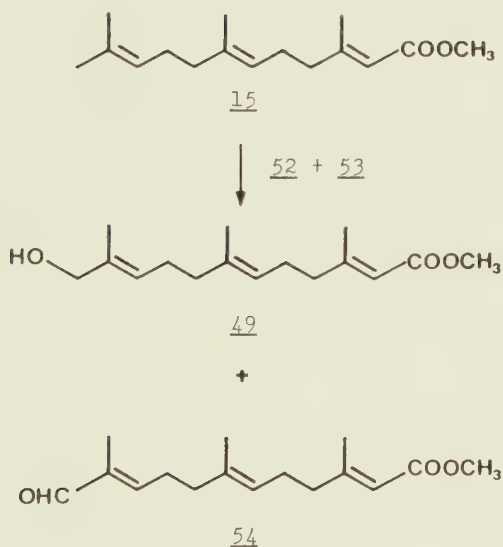
unterdrückt. Die Regioselektivität dieser Oxidation sei an der für diese Arbeit wichtigen Reaktion von 52/53 mit E,E-Farnesylsäuremethylester (15) demonstriert ^{f21)}, s. Schema 52. Unter den oben abgegebenen Reaktionsbedingungen erhielt man aus 15 in 75% Ausbeute ein 6:4 Gemisch von 49 und 54. Die gleiche Umwandlung ist mit SeO_2 unter thermischen Bedingungen oder in Gegenwart von TBPH bei 10° ¹²⁴⁾ nur mit Ausbeuten von 38% möglich.

Mit dieser Methode zur Allyloxidation sind Bedingungen gefunden worden, die selbst bei einer geringen Stereoselektivität der En-Reaktion die Anwendung auf den Abbau des Biosynthesezwischenproduktes zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den terminalen Methylgruppen erlauben, s. 2.9 und 3.4.9 ¹⁰⁶⁾.

f21)

Allyloxidationen mit 52/53 sind an 7 weiteren acyclischen Olefinen ausgeführt worden, wobei sich gezeigt hat, dass bei gleicher Regioselektivität und Stereoselektivität der Gesamtreaktion die Ausbeuten in allen Fällen deutlich über denen der Oxidation mit $\text{SeO}_2/\text{TBHP}/\text{H}^+$ ¹²⁴⁾ liegen ¹⁰⁶⁾.

Schema 52



3.4.9. Stereoselektivität der Allyloxydation mit Estern der selenigen Säure

In 3.4.8 ist gezeigt worden, dass sich die Ester der selenigen Säure hervorragend zur Allyloxydation trisubstituierter Olefine eignen. Es war nun erforderlich zu prüfen, in welcher Weise die Substituenten am Selen durch mögliche Wechselwirkungen mit dem Olefin die Stereoselektivität der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmenden En-Reaktion beeinflussen, vgl. 3.3.

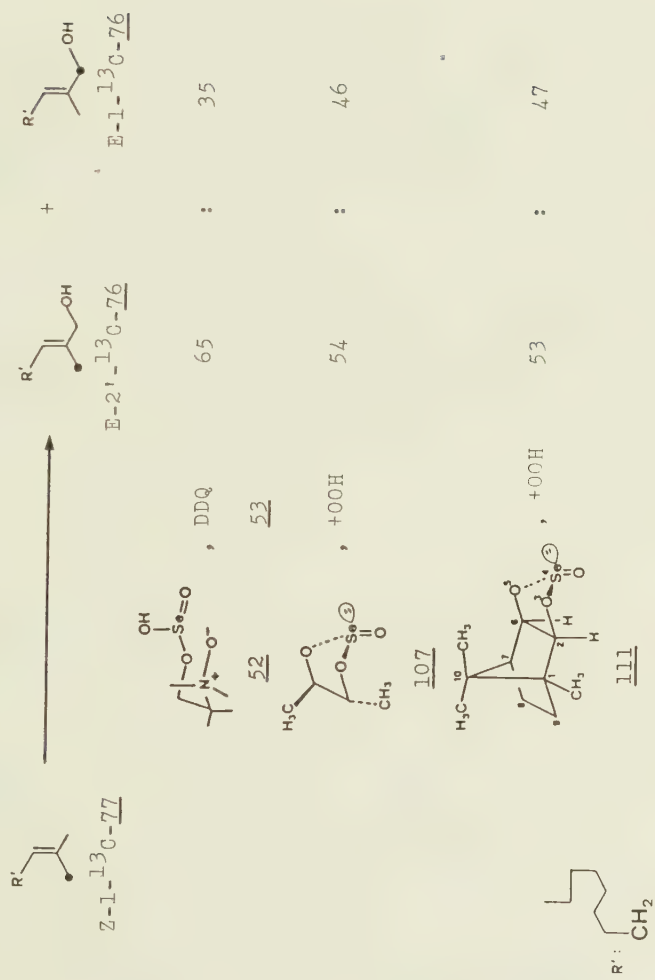
Zur Abklärung dieser Fragestellung wurden die stereo-

isotopomeren Olefine Z-1- ^{13}C -77 und E-1- ^{13}C -77 (90:10), zur Synthese vgl. 3.1, in 0,3 mM Ansätzen mit jeweils einem Äquivalent der cyclischen Selenite 107 und 111 in Gegenwart von TBHP bzw. mit dem Halbester 52 in Gegenwart von DDQ (53) umgesetzt. Nach vollständigem Eduktverbrauch wurde, wie in 3.4.8 beschrieben, aufgearbeitet und die konstitutionsisotopomeren Allylkohole E-2'- ^{13}C -76 und E-1- ^{13}C -76 sowie die entsprechenden Aldehyde E-2'- ^{13}C -127 und E-1- ^{13}C -127 im Verhältnis 70:30 isoliert (die Ausbeuten an 76 + 127 betrugen 72-87%). Die Analyse der ^1H -NMR-Spektren dieser Verbindungen ergab signifikante Veränderungen der Isotopomenverhältnisse während der Allyloxidation, aus denen die in Tabelle 13 angegebenen Stereoselektivitätswerte für die En-Reaktion berechnet wurden.

Daraus ist ersichtlich, dass die Stereoselektivität der En-Reaktion mit 52/53 von der gleichen Grössenordnung ist wie die mit SeO_2 , s. 3.3, während die Ester 107 und 111, von denen man eine differenzierende Wechselwirkung mit dem Olefin in den Uebergangszuständen A und B der En-Reaktion erartet hatte, s. Schema 53, den Energieunterschied zwischen diesen nivellieren, so dass praktisch keine Präferenz mehr für die E-Methylgruppe vorliegt.

Tabelle 13

Stereoselektivität der En-Reaktion in der Allyloxydation mit Estern der selenigen Säure

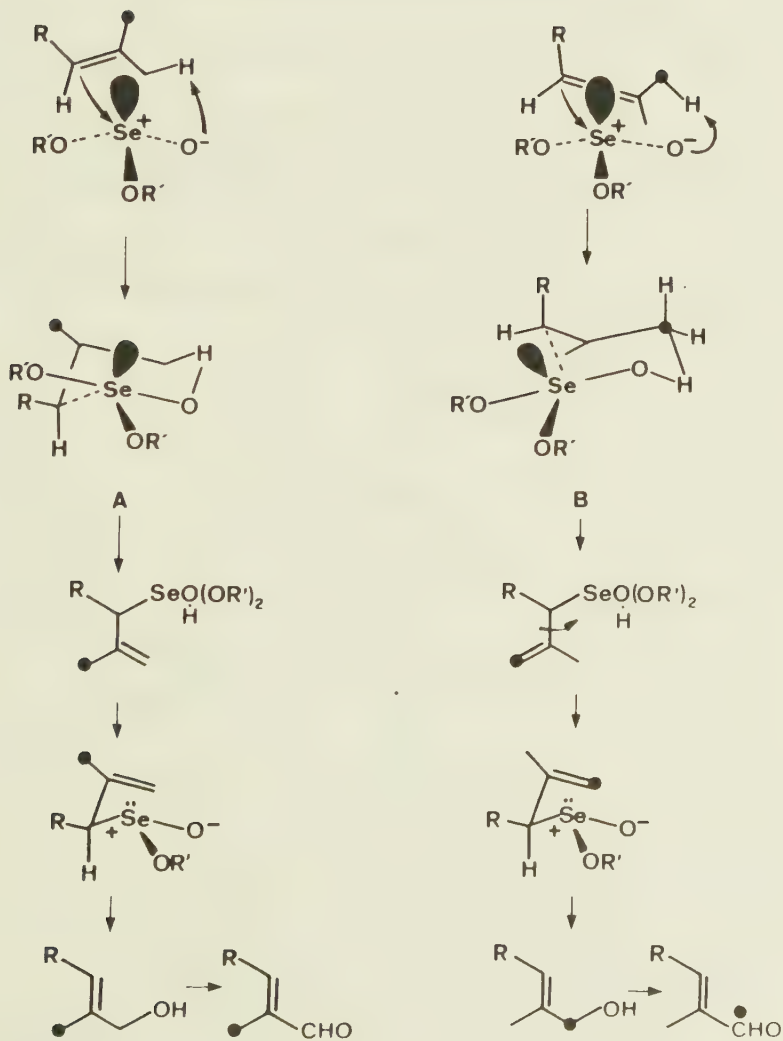


Eine Erklärung für das Reaktionsverhalten von 107 und 111 kann mit Hilfe der Darstellung in Schema 53 hergeleitet werden. Demnach verläuft der Angriff des Enophils über die Uebergangszustände A oder B, die beide durch eine trigonal-bipyramidale Konfiguration am Se charakterisiert sind, in der sowohl die sich bildende Se-C-Bindung als auch das freie Elektronenpaar am Selen laterale Positionen einnehmen. Es dürfte sich hierbei um die aus stereoelektronischen Gründen energieärmste Anordnung handeln ¹⁴⁴). Einer der Liganden OR' am Selen kann ebenfalls eine laterale Lage einnehmen, während der andere OR', wie auch die polarisierte Se=O-Doppelbindung apikal stehen müssen.

Ein signifikanter Energieunterschied zwischen A und B, wie bei der En-Reaktion mit SeO_2 in Aethanol bzw. mit dem Halbester 52, tritt offenbar dann auf, wenn die 1,3-diaxiale Wechselwirkung zwischen R und H dominiert und wenn für OR' die Möglichkeit besteht, in die sterisch weniger gehinderte laterale Position „auszuweichen“, während OH(=OR') apikal stehen kann.

Im Fall der cyclischen Ester 107 und 111 ist diese „Ausweichmöglichkeit“ nicht mehr vorhanden, so dass es zu einer ekliptischen Wechselwirkung von OR' mit dem R des Olefins kommt, und der Energieunterschied zwischen A und B verschwindet bzw. keine Stereoselektivität in der En-Reaktion auftritt.

Schema 53

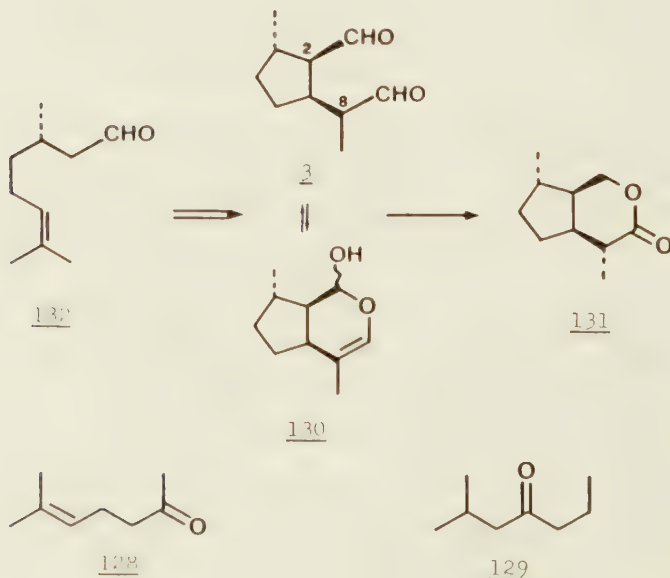


4. Die Biosynthese des Iridodials (3)

4.1. Einleitung, Problemstellung und Zielsetzung

Iridodial (3) ist eine Komponente des Gemisches von an C-2 und C-8 stereoisomeren Monoterpenaldehyden, s. Schema 54, das von Ameisen der Familie Dolichoderinae als Abwehrsekret aus einer ventral liegenden Analdrüse abgegeben wird ^{180,181)}. 3 ist ausserdem aus den Analdrüsen von Käfern der Familien Staphylinidae ¹⁸²⁾ und Cerambycidae ¹⁸³⁾ isoliert worden.

Schema 54



Es handelt sich um eine angenehm riechende Verbindung, deren ausgeprägte Polymerisationstendenz als Grundlage für eine wirksame Verteidigung angesehen wird. Es wird vermutet, dass 3 als Fixativ für die gleichzeitig abgegebenen, insektiziden Ketone Methylheptenon (128) und Propylisobutylketon (129) dient ¹⁸¹).

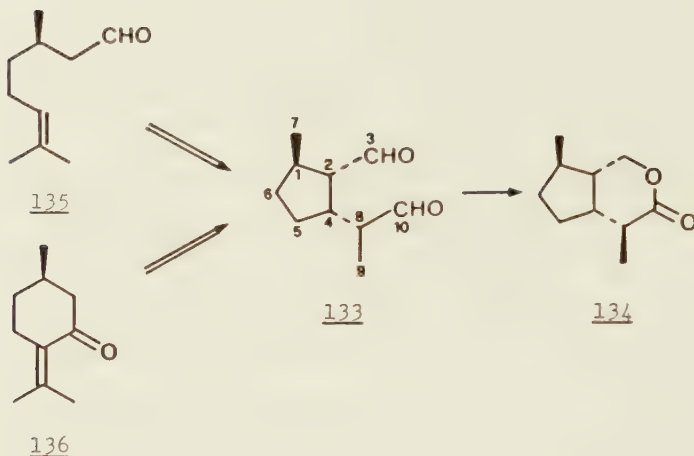
Die Handhabung von 3 wird erschwert durch Empfindlichkeit gegen Luft, Säuren und Basen. Die direkte Strukturbestimmung bereitete Schwierigkeiten auf Grund des in Schema 54 formulierten Gleichgewichts mit dem Enolhalbacetal 130 und beruht deshalb hauptsächlich auf der Umwandlung von 3 in das ebenfalls natürlich vorkommende, stabile L-(-)-Isoiridomyrmecin (131) ^{180, 181}), das auch das Endprodukt einer Iridodialsynthese ausgehend von L-(-)-Citronellal (132) war ¹⁸⁴).

D-(+)-Isoiridomyrmecin (134) und das Enantiomere des natürlichen Iridodials, im weiteren zur Abgrenzung als (1R)-Iridodial (133) bezeichnet, sind synthetisch leichter zugänglich, da die chiralen Ausgangsmaterialien D-(+)-Citronellal (135) und D-(+)-Pulegon (136) ¹⁸⁵) natürlich vorkommende Terpene sind, s. Schema 55.

Im Gegensatz zu den pflanzlichen Iridoiden ⁷⁶), deren terpenoide Biogenese weitgehend aufgeklärt ist ^{78,79,186,187}), ist nicht bekannt, ob die oben genannten Insekten Iridodial aus Mevalonat aufbauen können.

Unser Plan war, unter möglichst natürlichen Bedingungen 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) an Tapinoma nigerrium (Doli-

Schema 55



choderinae, Formicidae) zu applizieren und einen Abbau für Iridodial auszuarbeiten. Das zur Ausführung des Abbaus und als Verdünnungsmaterial für die biosynthetisierte Probe benötigte Iridodial musste synthetisiert werden, wobei als einzige chirale Edukte (+)-Pulegon (136) und (+)-Citronellal (135) zur Verfügung standen, so dass das natürliche Iridodial (2) nur mit seinem Enantiomeren (1R)-Iridodial (133) verdünnt werden konnte. Folglich war es notwendig, dass der Abbau keine enantio-differenzierenden Arbeitstechniken enthielt und zu achiralen, kristallinen Abbauprodukten für die Bestimmung

der spezifischen Aktivität führte. Ferner sollte mit diesem Abbau die Radioaktivität der C-Atome 9 und 10 des Iridodials getrennt bestimmt werden, um eine eventuelle Randomisierung der Markierung nachweisen zu können, vgl. 2.9.

4.2. Synthesen des nicht natürlich vorkommenden

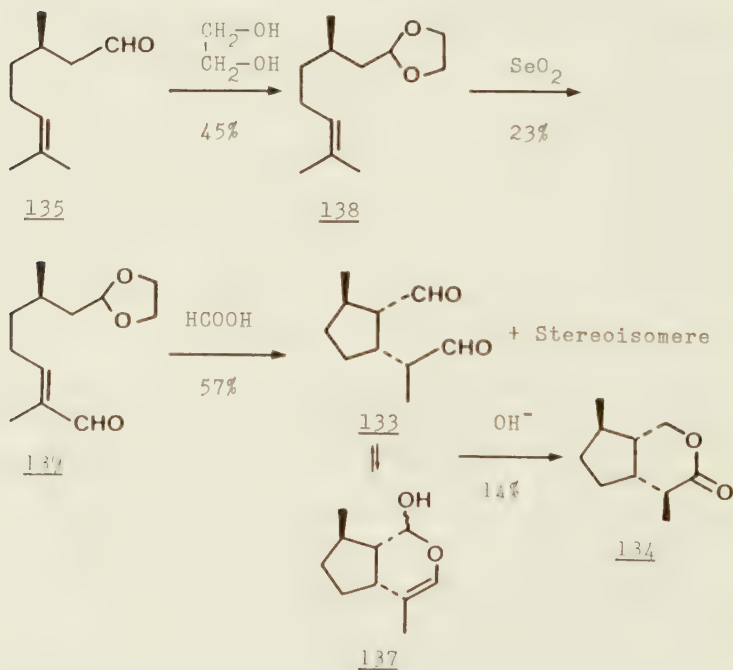
(1R)-Iridodials (133)

Es wurden zwei Synthesen für (1R)-Iridodial (133) ausgeführt, die relativ problemlos nach den Angaben der Literatur verliefen. Beide Synthesen unterscheiden sich wesentlich im Aufwand. Während die Methode von Clark ¹⁸⁴⁾, ausgehend von (+)-Citronellal (135) in drei Stufen, s. Schema 56, mit einer Gesamtausbeute von 6% ein Stereoisomerengemisch (gemäss GC 5 Peaks) von 133 lieferte, erhielt man nach Cavill ¹⁸⁵⁾, ausgehend von (+)-Pulegon (136), in 11 Stufen und 1% Ausbeute eine nach Destillation gemäss DC einheitliche Verbindung, die in Uebereinstimmung mit den Angaben von Cavill ¹⁸⁵⁾ gaschromatographisch nur einen Peak zeigte und spektroskopisch (IR, ¹H-NMR) auf ein Gleichgewicht ¹⁸²⁾ zwischen 133 und dem entsprechenden Enolacetal 137 hinweist, s. Schemata 56 und 57.

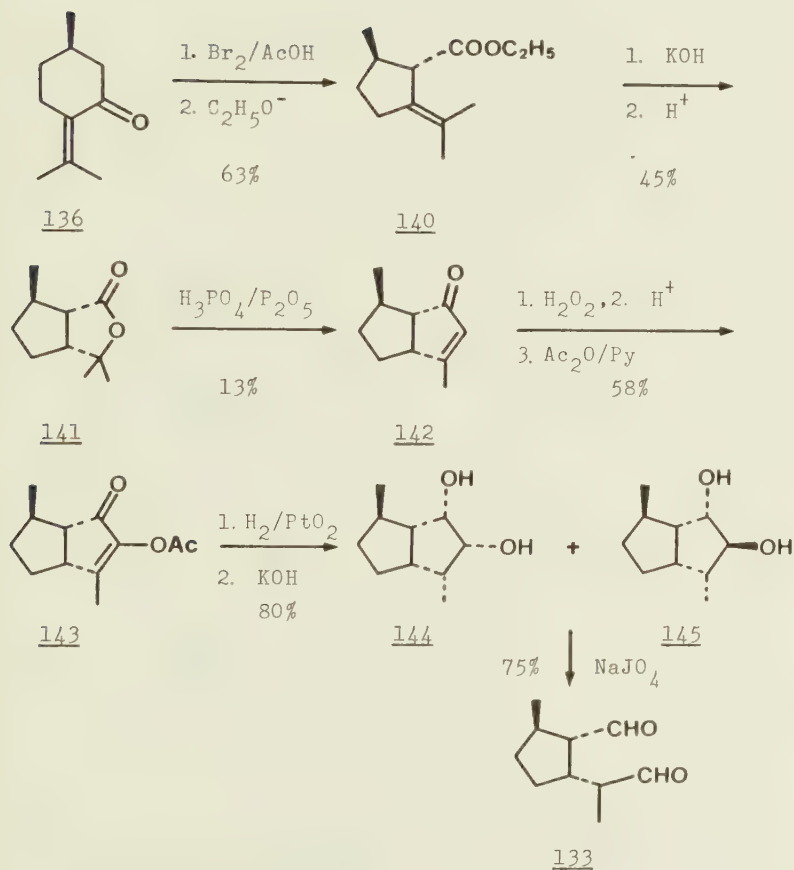
Die Produkte beider Synthesen können in (+)-Isoiridomyrcin (134) umgewandelt werden. Während aber für die Darstellung von 134 aus dem Stereoisomerengemisch der ersten Synthese nur eine Ausbeute von 14% erhalten wurde ¹⁸⁴⁾, erwartete man für die Reaktion des Cavill'schen Iridodials

(133) einen grösseren Umsatz. Demzufolge war dieses gaschromatographisch reine 133 zur Verdünnung des radioaktiven Biosyntheseproduktes vorgesehen, während das leichter zugängliche Stereoisomere ngemisch zur Ausarbeitung des inaktiven Abbaus von 134 eingesetzt wurde.

Schema 56



Schema 57 f22)



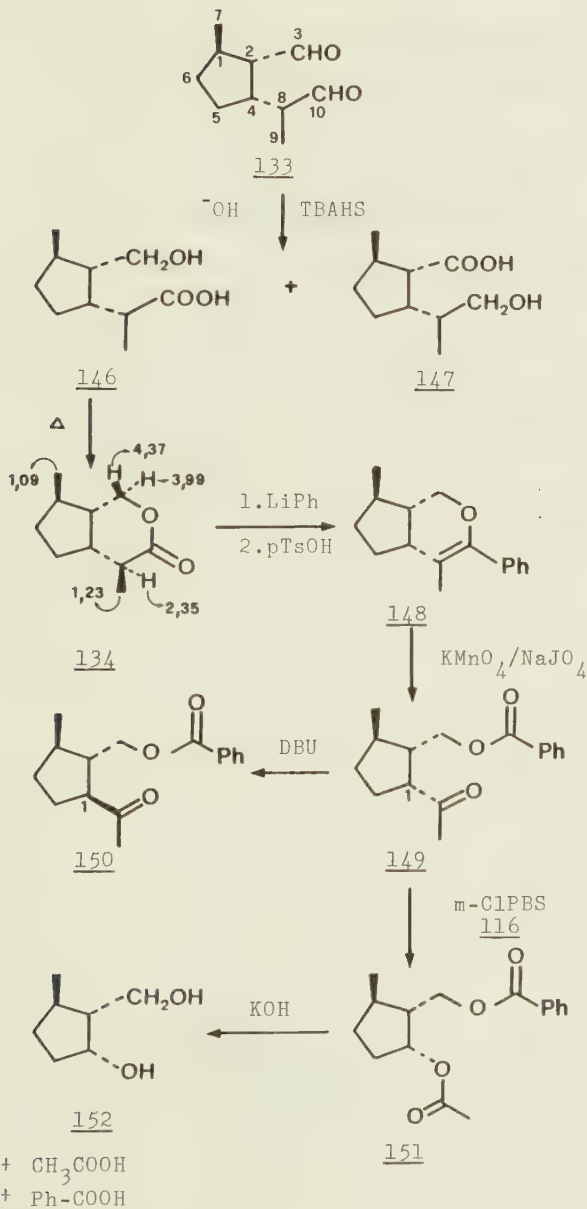
f22)

Auf Grund der Chiralität des (+)-Pulegons (136) und einer Röntgenstrukturanalyse von 145, ausgeführt von J. Bieri & R. Prevo, ist gesichert, dass das Diol 145 die angegebene absolute Konfiguration hat.

4.3. Abbau von (1R)-Iridodial (133) via (+)-Iso-
iridomyrmecin (134)

Der Abbau von (1R)-Iridodial (133) nach Schema 58 führte mit Hilfe einer intramolekularen Cannizzaro Reaktion, die im Zweiphasensystem mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) als Phasentransferkatalysator durchgeführt wurde ¹⁸⁸⁾, zunächst zu einem Gemisch von Hydroxysäuren 146 und 147, aus dem die schwerer lösliche Komponente 146 in 17% Ausbeute isoliert werden konnte. Die Struktur dieser Verbindung ist durch die spektroskopischen Daten gesichert, insbesondere aber durch die beim Destillieren (120°/0,2 Torr) spontan mit 92% eintretende Laktonisierung zum (+)-Isoiridomyrmecin (134). Sämtliche physikalischen Parameter von 134 sind identisch mit den Angaben von Cavill ¹⁸⁹⁾ und Wolinsky ¹⁹⁰⁾ (Smp.: 56,3-56,8°; $[\alpha]_D^{25} = +61,1^\circ$, $c=1,15$, CCl_4). Addition von LiPh an das Lakton 134, gefolgt von säurekatalysierter Wasserabspaltung lieferte mit 71% Ausbeute den GC-reinen Aether 148 als Öl ($[\alpha]_D^{20} = -104^\circ$, $c=1,04$, CCl_4), dessen Doppelbindung mit $\text{KMnO}_4/\text{NaJO}_4$ in wässrigem t-Butanol geöffnet wurde. Man erhielt in 53% Ausbeute den Ketoester 149 ($[\alpha]_D^{21} = -77,8^\circ$, $c=1,26$, CHCl_3) mit Retention der Konfiguration an C-1. Epimerisierung von 149 mit DBU bei 25° ergab 150, dessen ¹H-NMR-Spektrum in Übereinstimmung mit literaturbekannten Analogiefällen ¹⁹¹⁾ deutlich von 149 verschieden ist;

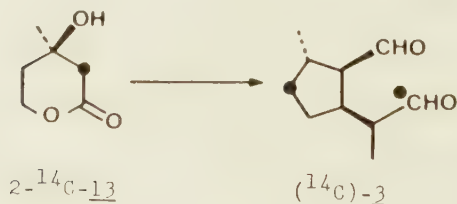
Schema 58



das H an C-1 von 150 ist um 0,33 ppm gegenüber dem von 149 hochfeldverschoben, und es sind für die beiden Protonen an C-2' zwei gut aufgelöste d x d sichtbar. Die Baeyer-Villiger-Oxidation von 149 mit zwei Äquivalenten m-Chlorperbenzoesäure (116) in CHCl_3 führte nach 14 Tagen bei 25° unter Retention der Konfiguration an C-1 ¹⁹²) in 81% zum Diester 151 ($[\alpha]_D^{22} = -95,1^\circ$, $c=1,07$, CHCl_3). Die anschließende Verseifung in methanolischer KOH ergab in 55% spektroskopisch reines Diol 152 als Öl sowie Essigsäure (C-8 + C-9 des Iridodials 133) und Benzoessäure (C-10 von 133), die in Form der kristallinen p-Bromphenacyl ester in 60 bzw. 63% Ausbeute isoliert wurden, vgl. 2.9.3. 152 lässt sich weiter durch eine Kuhn-Roth Oxidation abbauen, vgl. 2.7, so dass die Aktivität von C-1 + C-7 von 133 bestimmt werden können.

Demnach kann mit Hilfe dieses Abbaus die Radioaktivitätsverteilung im biosynthetisierten Iridodial (¹⁴C)-3 nach Inkorporation von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13) und die Spezifität eines solchen Einbaus angegeben werden, s. Schema 59.

Schema 59



4.4. Inkorporation von 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13)
in Tapinoma nigerrimum (Dolichoderinae)

Einem aus der Gegend von Nizza stammenden Ameisen-nest von Tapinoma nigerrimum wurde während 7 Tagen in 6 Portionen insgesamt 1mCi 2-¹⁴C-Mevalonat (2-¹⁴C-13; $1,5 \times 10^{10}$ dpm/mmol) gefüttert, das auf frischem Grillenfleisch angeboten wurde .

Das Futterdepot befand sich etwa 25 cm entfernt vom intakten Nest, das bei einer Temperatur von $22 \pm 2^{\circ}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 70% gehalten wurde.

Nachdem die Ameisen den grössten Teil der Nahrung abtransportiert hatten, wurden sie von der Erde abgesaugt, durch Einfrieren getötet und anschliessend mit Pentan extrahiert. Der Pentanextrakt enthielt 1% der applizierten Radioaktivität und zeigte im GC zwei Iridodialpeaks im Verhältnis 52:48, wovon die Hauptkomponente identisch war mit dem (1R)-Iridodial (133) aus der Synthese nach Cavill ¹⁸⁵), s. 4.2.

Man verdünnte mit 1,73 g 133 und erhielt in 54% Ausbeute die Hydroxysäure 146 (0,03% der applizierten Aktivität), s. Schema 58, die durch Destillation in (+)-Isoiridomyrmecin (134) mit 92% umgewandelt wurde.

134 besass eine spezifische Aktivität von 26 ± 2 dpm/mg bzw. 4332 dpm/mmol entsprechend $3 \times 10^{-5}\%$ der applizierten molaren Aktivität von 2-¹⁴C-13. Die Total-

aktivität des Iscoiridomyrmecins (134) betrug 0,2% des Pentanextraktes bzw. 0,001% der applizierten Gesamtaktivität.

Die niedrige spezifische Aktivität von 134 liess die Durchführung des Abbaus nach Schema 58 nicht zu.

Aus den extrem niedrigen Einbauraten muss man die Schlussfolgerung ziehen, dass die Ameisen Tapinoma nigerrimum unter den Versuchsbedingungen kein Iridodial biosynthetisiert hatten ⁹⁵⁾.

5. Die Biosynthese des Coccinellins (2)

5.1. Einleitung und Problemstellung

Coccinellin (2) ist die Hauptkomponente des Abwehrsekretes von Coccinella septempunctata (Coccinellidae, Coleoptera). Ähnlich wie Cantharidin (1) wird 2 in der Haemolympe gelöst beim Angriff zwischen Tibia und Femur abgegeben („Reflex-Bleeding“) und wirkt als „Feeding Deterrent“ insbesondere gegen Ameisen. Dieser biologische Test wurde von Tursch erfolgreich bei der Isolierung von 2 und einer Reihe strukturverwandter Alkaloide verwendet ^{193, 194}). Die Struktur des Coccinellins (2) ist gesichert durch eine Röntgenstrukturanalyse ¹⁹⁵) und durch Synthesen von Ayer und Stevens ^{196, f23}).

Die Biosynthese des Coccinellins (2) wurde ebenfalls von Tursch untersucht ¹⁹⁷) und eine Einbaurate von $10^{-4}\%$ für 1-¹⁴C- bzw. 2-¹⁴C-Acetat bestimmt.

f23)

Strukturverwandte Alkaloide sind auch aus der Euphorbiacee Poranthera corymbosa isoliert worden ¹⁹⁸), zur Synthese dieser Verbindungen vgl. ¹⁹⁹).

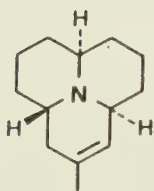
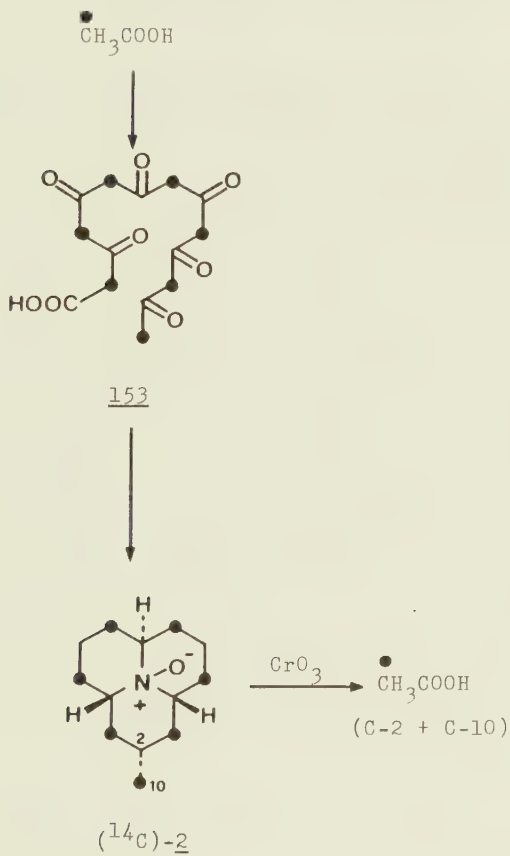
Auf Grund seiner Symmetrie bereitet der Nachweis einer spezifischen Inkorporation in Coccinellin (2) ähnliche Schwierigkeiten wie in Cantharidin (1). Tursch beschränkte sich deshalb beim Abbau von 2 auf eine Kuhn-Roth-Oxidation, die die C-Atome C-2 + C-10 als Essigsäure liefert und die nach Applikation von 1-¹⁴C-Acetat 16,7% und nach Fütterung von 2-¹⁴C-Acetat 14,3% der molaren Aktivität von 2 enthielt, s. Schema 60. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Coccinellin (2) über das Polyketid 153 biosynthetisiert wird ¹⁹⁷).

Diese Interpretation ist aus zwei Gründen fragwürdig:

- 1.) Bei Separierung von 2 aus 13 C-Atomen des Coccinellins (2) würde man bei vollständiger Randomisierung der inkorporierten Radioaktivität 15,4% der molaren Aktivität von 2 isolieren, ein Wert, der innerhalb der Fehlergrenze der Abbauresultate von Tursch liegt.
- 2.) Da der Einbau von Acetat via Mevalonat in diesem Fall das gleiche Resultat ergibt wie eine Polyketidbiosynthese ist eine terpenoide Biogenese des Coccinellins (2) nicht auszuschliessen.

Man entschloss sich deshalb im Hinblick auf detailliertere Experimente mit dem leichter abzubauenen Hippocasin (154), das aus kanadischen Coccinelliden isoliert werden kann, zunächst auf einfache Weise die fragliche Spezifität des Acetat-Einbaus in C. septempunctata zu überprüfen.

Schema 60



154

5.2. Inkorporation von 2-¹⁴C-Acetat in *Coccinella septempunctata* (Coccinellidae)

Unter CO₂-Narkose wurde eine wässrige Lösung von 1 mCi 2-¹⁴C-Acetat (1,22 x 10¹¹ dpm/mmol) 81 *Coccinella septempunctata* ^{f24)} seitlich ins Abdomen injiziert. Die Käfer wurden 14-15 Tage ^{f25)} in einem Käfig gehalten, der eine natürliche Bewachsung und eine grössere Menge Blattläuse als Nahrung enthielt. Anschliessend wurden die Insekten durch Einfrieren getötet, zermahlen und dreimal 8 Stunden bei 25° mit Methanol extrahiert. Zur Entfernung der Fette wurde der Methanol-Extrakt mit Wasser verdünnt und mehrmals mit Hexan extrahiert. Die Methanol-Wasser - Phase wurde dann eingedampft, der Rückstand in CHCl₃/CH₃OH (19:1) aufgenommen, durch Al₂O₃ filtriert und anschliessend durch Gradient-SC an Kieselgel aufgetrennt (CHCl₃/CH₃OH/NH₃; 49:1:5 → 19:1:2). Das isolierte N-oxid 2 wurde in

f24)

Die Insekten stammten aus einer Zucht von Frau M. Stahel, Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftl. Pflanzenbau im Reckenholz, Zürich.

f25)

Es wurden noch zwei weitere Versuche mit Ueberlebenszeiten von 24 und 72 Stunden unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt; dabei wurde eine kleinere Einbaurate gefunden ⁹⁵⁾.

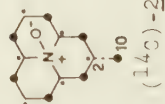
Uebereinstimmung mit den Angaben von Tursch ¹⁹⁴⁾
durch IR, MS und Elementaranalyse identifiziert
und nach Behandlung mit wenig konz. HCl in Aceton in
29,5 mg kristallines Coccinellinhydrochlorid (¹⁴C)-2xHCl
übergeführt. Man verdünnte mit 65,9 mg inaktivem 2xHCl ^{f26)}
und kristallisierte aus Methanol/Aceton bis zur kon-
stanten spezifischen Aktivität, s. Tabelle 14.
Anschliessend wurde eine Kuhn-Roth-Oxidation ausgeführt ⁵¹⁾
und die eine Hälfte der gebildeten Essigsäure mit 70%
in den p-Bromphenacyl-ester umgewandelt, während die
andere Hälfte mit Natriumazid und Polyphosphorsäure
in einer geschlossenen Apparatur bei 80° zu CO₂ und
Methylamin abgebaut wurde ⁵¹⁾; die spezifischen Aktivi-
täten dieser Verbindungen wurden an BaCO₃ bzw. Methyl-
ammoniumpikrat bestimmt.
Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, wird das mit einer
Einbaurate von $1 \times 10^{-2}\%$ gebildete Coccinellin (¹⁴C)-2
offensichtlich nicht spezifisch, wie von Tursch formuliert,
aus 2-¹⁴C-Acetat biosynthetisiert, da sowohl C-10 als
auch C-2 des Coccinellins radioaktiv markiert sind.

f26)

Das inaktive Coccinellinhydrochlorid (2)xHCl wurde
aus Coccinellin (2) erhalten, das man in gleicher
Weise aus 57,3 g Coccinella septempunctata isoliert
hatte, die in der Nähe von Rorschach gesammelt worden
waren.

Tabelle 14

Abbau von ^{14}C -2 nach Inkorporation von 2- ^{14}C -Acetat in 81 *Coccinella septempunctata*



dpm/mmol

rel. %

100

$2,57 \times 10^6$

CH_3COOH (C-2 + C-10)

14,7

$3,78 \times 10^5$

CO_2 (C-2)

4,0

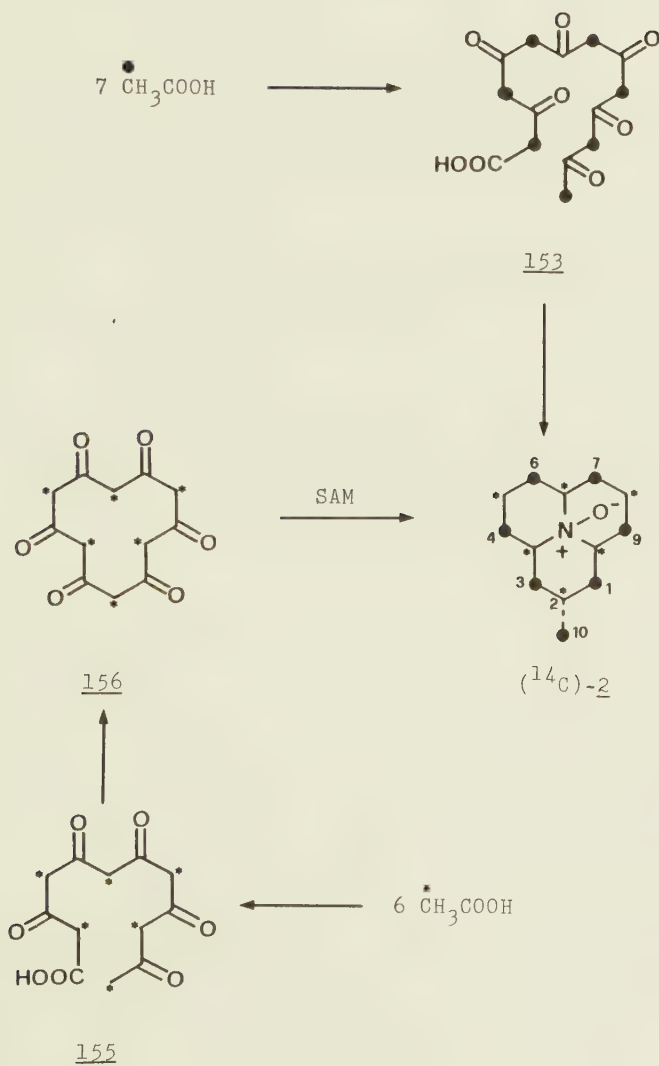
$1,03 \times 10^5$

CH_3NH_2 (C-10)

10,6

$2,72 \times 10^5$

Schema 61



Für die Markierungsverteilung von 2,7:1 zugunsten von C-10 des Coccinellins (^{14}C)-2 sind zwei Erklärungen denkbar.

Das gesamte Kohlenstoffgerüst von (^{14}C)-2 ist via den C-1 - Pool mit 50% der molaren Aktivität gleichmässig markiert worden, die anderen 50% sind spezifisch auf C-1, C-3, C-4, C-6, C-7 und C-9 verteilt und direkt von 2- ^{14}C -Acetat inkorporiert worden.

Eine andere Möglichkeit ist im Schema 61 formuliert. Demnach wird Coccinellin (2) bevorzugt über das Heptaketid 153 aufgebaut und alternativ über das Hexaketid 155 biosynthetisiert, wobei die für das Coccinellin fehlende Methylgruppe durch S-Adenosylmethionin (SAM) eingeführt wird ⁹⁵).

Zusammenfassung

In einer kurzen Einführung wird die Problematik der Biosyntheseuntersuchungen von Arthropodenhormonen, -pheromonen und -allomonen diskutiert und die Resultate anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema zusammenfassend dargestellt.

Zum Problem der Biosynthese des Cantharidins wurden ausgehend von in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Schmidt† durchgeführten Experimenten die folgenden Ergebnisse erzielt.

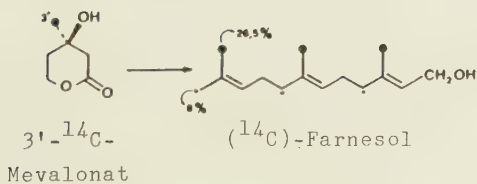
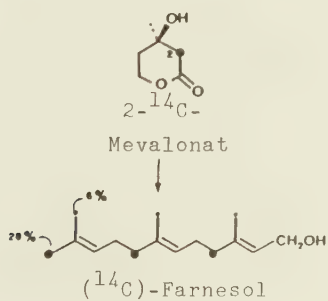
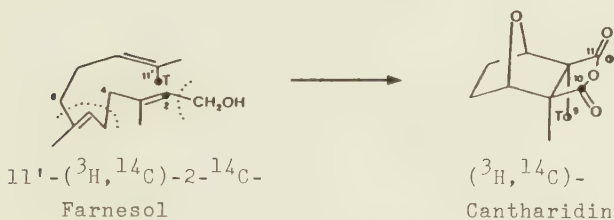
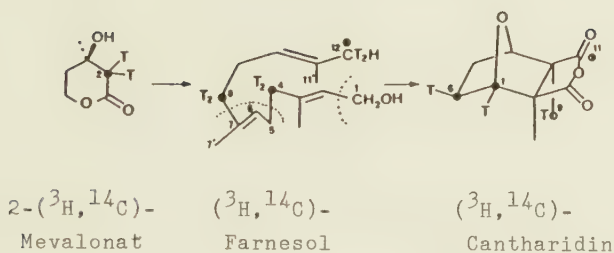
Cantharidin, der toxische Abwehrstoff von Lytta vesicatoria (Meloidae, Coleoptera) wird in der dritten Anhangsdrüse des Genitalapparates der männlichen Insekten biosynthetisiert. Von dort wird das Allomon quantitativ während der Kopulation in das Receptaculum der weiblichen Käfer übertragen, die selbst kein Cantharidin aus terpenoiden Vorläufern synthetisieren können. Bei der Befruchtung wird das Cantharidin in das Eigelege übertragen und erfüllt so seine Schutzfunktion als „Feeding Deterrent“ für die nächste Generation. Beobachtungen des Kopulationsverhaltens von Lytta vesicatoria und die Analyse von Elektroantennogrammen legen die Vermutung nahe, dass Cantharidin für die Meloiden nicht nur die Bedeutung eines Allomons hat sondern auch als Pheromon wirksam ist.

Die Spezifität der Biogenese des Cantharidins wurde durch den „enantioselektiven“ Abbau eines nach Applikation von 2-(^3H , ^{14}C)-Mevalonat isolierten Cantharidins untersucht. Demnach wird das achirale Cantharidin aus einer chiralen Faltung des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol unter Abspaltung von C-1, C-5, C-6, C-7 und C-7' gebildet, s. Schema 62.

Inkorporationsversuche mit synthetischem 11'-(^3H , ^{14}C)-Farnesol zeigten, dass die terminalen Methylgruppen des Sesquiterpens während der Umwandlung in Cantharidin randomisiert werden. Durch Experimente mit synthetischem 11'-(^3H , ^{14}C)-2- ^{14}C -Farnesol wurde nachgewiesen, dass beide Farnesolfragmente, C-2 - C-4 und C-8 - C-12, mit gleichen Raten in Cantharidin eingebaut werden. Daraus lässt sich schliessen, dass die oxidative Cyclisierung des Farnesols enzymgebunden erfolgt; für diese ungewöhnliche Transformation wird ein Mechanismus vorgeschlagen unter Berücksichtigung aller experimentellen Resultate.

Die Stereospezifität der Biosynthese des isolierbaren Zwischenproduktes Farnesol wurde untersucht durch Inkorporation von 2- ^{14}C -Mevalonat und synthetischem 3'- ^{14}C -Mevalonat unter Anwendung einer speziell entwickelten, oxidativen Abbaureaktion, die eine getrennte Bestimmung der Radioaktivität der terminalen Methylgruppen des Farnesols ermöglicht. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl C-2 als auch C-3' des Mevalonats in einem Ausmass von 80:20 bei der Bildung des Farnesols „randomisiert“ werden, s. Schema 62.

Schema 62

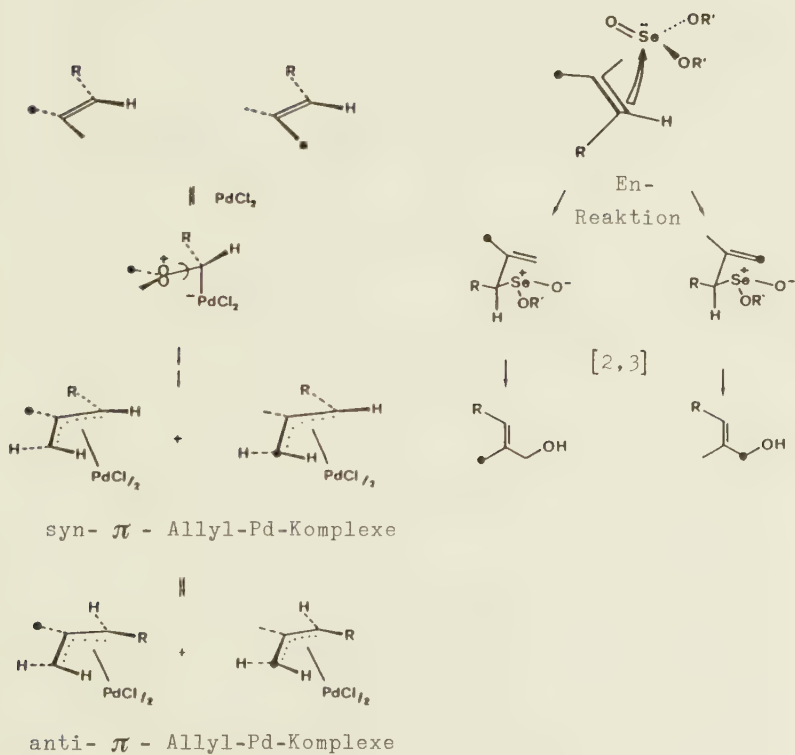


In Zusammenhang mit der Untersuchung der Stereoselektivität der Farnesolbildung in Lyttia vesicatoria erwies es sich als notwendig, verschiedene Abbaureaktionen zu testen, die die terminalen Methylgruppen des Sesquiterpens selektiv in unterschiedliche Oxidationsstufen überführen. Zu dem Zweck wurde an synthetischen ^{13}C -markierten Olefinen die Allyloxidation mit SeO_2 und mit Estern der selenigen Säure untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass mit cyclischen Estern der selenigen Säure die H-Abstraktion aus den Methylgruppen einer Dimethylallyl-einheit (En-Reaktion) unselektiv verläuft, hingegen fand man eine signifikante En-Stereoselektivität für SeO_2 und einen Halbester der selenigen Säure. Daraus ergeben sich neue, wesentliche Erkenntnisse über den Mechanismus dieser Allyloxidationen, s. Schema 63.

Darüberhinaus wurden Informationen über die bisher wenig untersuchten Ester der selenigen Säure zusammengetragen: es wurden die ^{77}Se -NMR-Spektren dieser Verbindungen gemessen und die Aktivierungsenergie der pyramidalen Inversion acyclischer Selenite bestimmt. Im Gegensatz zu den acyclischen Seleniten sind die cyclischen, fünfgliedrigen Ester konfigurationsstabil, und es ist auf Grund der NMR-Spektren gesichert, dass eine dieser Verbindungen eine definierte Chiralität am Selen aufweist.

Bei der Evaluation der präparativen Möglichkeiten erwiesen sich die Selenite in Gegenwart von *t*-Butylhydro-

Schema 63



peroxid oder 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon als hervorragende Reagenzien für die selektive Allyl-oxidation trisubstituierter Olefine.

Als Alternative zur SeO_2 -Oxidation für die Modifizierung des Biosynthesezwischenproduktes Farnesol wurde die Bildung des terminalen π -Allyl-Pd-Komplexes in Erwägung gezogen. Die Untersuchung der „Palladierung“ mit einem ^{13}C -markierten Olefin ergab neue Hinweise auf den Bildungsmechanismus acyclischer π -Allyl-Pd-Komplexe.

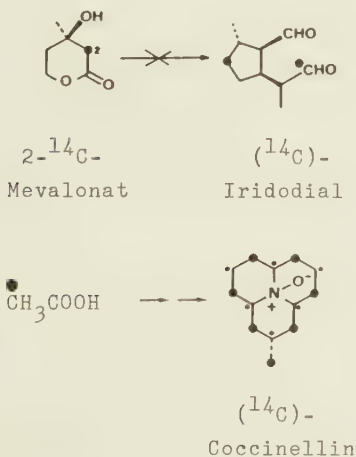
Demnach verläuft die Reaktion über ein Zwischenprodukt mit Pd-C- σ -Bindung, das im Gleichgewicht mit dem Olefin steht. Die H-Abstraktion aus den Methylgruppen ist unselektiv und das Produkt nicht eine einzige Verbindung sondern eine Mischung der syn- und anti- π -Allyl-Pd-Komplexe, die im Gleichgewicht vorliegen. s. Schema 63

Zur Aufklärung der Biosynthese des Iridodials, des charakteristischen Allomons von Ameisen der Familie Dolichoderinae, wurden zur Herstellung von inaktivem Verdünnungsmaterial zwei Synthesen nach Angaben der Literatur ausgeführt. Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung im Iridodial wurde ein inaktiver Abbau via Isoiridomyrmecin ausgearbeitet. Nach Applikation von 2- ^{14}C -Mevalonat an ein intaktes Nest von Tapinoma nigerrimum (Dolichoderinae) wurde aus dem isolierten Iridodial ein Isoiridomyrmecinpräparat derart kleiner

spezifischer Aktivität erhalten, dass eine Bestimmung der spezifischen Inkorporation des Vorläufers nicht möglich war, s. Schema 64.

Das tricyclische Alkaloid Coccinellin, ein Abwehrstoff der Käfer Coccinella septempunctata (Coccinellidae), wird nach unseren Ergebnissen mit einer Einbaurate von $10^{-2}\%$ aus 2- ^{14}C -Acetat biosynthetisiert. Abbaureaktionen zeigten allerdings, dass der Einbau des Vorläufers nur teilweise spezifisch erfolgt, s. Schema 64.

Schema 64



Dank

Ein Teil der Experimente, die in der vorliegenden Arbeit interpretiert werden, ist in enger Zusammenarbeit mit Suzanne Hauffe, Felix Ruther, Immanuel Lüscher und Jorge R. Sierra entstanden; für Ihre engagierte Mitwirkung bin ich Ihnen sehr dankbar ebenso für die wohlwollend kritischen Bemerkungen von Prof. H. Schmid† in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Prof. A.S. Dreiding und seinen Mitarbeitern, die mich nach meiner Rückkehr aus Cambridge vorbehaltlos in Ihre Gruppe aufgenommen haben. Ausser Ihnen haben eine Reihe von Kollegen und Freunden im Laufe der Jahre mehr oder minder freiwillig meinen Problemen zugehört, stellvertretend für alle möchte ich Armin Guggisberg, Georg Frater und Reinhard Neier herzlich für viele Diskussionen danken.

Andreas Hafner, Roland W. Kunz und Kurt Schenker, die die NMR-Spektren aufgenommen haben und Hans Frohofer, der mit der Durchführung der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Bestimmungen einen grossen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat, danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft.

Literaturverzeichnis

- 1) W.L. Brown, Amer. Naturalist 102, 188 (1968);
W.L. Brown, Bioscience 20, 21 (1970).
- 2) M. Rockstein, „Biochemistry of Insects“, Acad. Press,
New York - San Francisco-London, 1978.
- 3) P. Karlson & L. Lüscher, Nature (London) 183, 55 (1959).
- 4) A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm & E. Hecker, Z.
Naturforsch. 14b, 283 (1959).
- 5) Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen
Gesellschaft Vol. 44, Nr. 1/2 (1971).
- 6) P. Karlson & D. Schneider, Naturwissenschaften 60,
113 (1973).
- 7) H. Röllner, K.H. Dahm, C.C. Sweeley & B.M. Trost
Angew. Chem. 79, 190 (1967).
- 8) A.S. Meyer, H.A. Schneidman, E. Hanzmann & I.H. Ko,
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 60, 853 (1968).
- 9) K.J. Judy, D.A. Schooley, L.L. Dunham, M.S. Hall,
B.J. Bergot & J.B. Siddall, Life Sci. 13, 1511 (1973).
- 10) B.M. Trost in „Insect Juvenile Hormones“, ed. J.J. Menn &
M. Beroza, Acad. Press, London 1972, p. 217.
- 11) R. Rossi, Synthesis 1977, 817; idem. ibid. 1978, 413.
- 12) R. Baker & D.A. Evans, The Chem. Soc. Spec. Periodic
Rep., Aliphatic and Related Natural Product Chemistry
Vol. 1, 102 (1979); R. Baker & J.W.S. Bradshaw, ibid.
Vol. 2, 46 (1981); R. Baker & J.W.S. Bradshaw, ibid.
Vol. 3, 66 (1983).

- 13) K. Mori in "Recent Developments in the Chemistry of Natural Carbon Compounds" Vol. 9, Academiai Kiadó, Budapest 1979, p.11.
- 14) P. Karlson & H. Hoffmeister, Z. physiol. Chem. 331, 298 (1963).
- 15) M. Koreeda, H. Moriyama, K. Nakanishi, S. Imai & T. Okauchi in Symposium Papers of the 12th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Sapporo 1969, p. 12^a.
- 16) D.H.S. Horn, E.J. Middleton, J.A. Wunderlich & F. Hampshire, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1966, 339.
- 17) W.E. Bollenbacher, M.N. Galbraith, L.I. Gilbert & D.H.S. Horn, Steroids 29, 47 (1977).
- 18) D.A. Schooley, K.J. Judy, B.J. Bergot, M.S. Hall & J.B. Siddall, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 2921 (1973).
- 19) R.C. Jennings, K.J. Judy & D.A. Schooley, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1975, 21.
- 20) M.G. Peter & K.H. Dahm, Helv. Chim. Acta 58, 1037 (1975).
- 21) L.B. Hendry, B. Piatek, L.E. Browne, D.L. Wood, J.A. Byers, R.H. Fish & R.A. Hicks, Nature (London) 284, 485 (1980); J.A. Byers, Insect Biochem. 11, 563 (1981).
- 22) J.A. Byers & D.L. Wood, Science 213, 763 (1981).
- 23) G.M. Happ & J. Meinwald, J. Am. Chem. Soc. 87, 2507 (1965).

- 24) J. Meinwald, G.M. Happ, J. Labows & T. Eisner,
Science 151, 79 (1966).
- 25) P. Schmialek, Z. Naturforsch. 18b, 462 (1963).
- 26) E.E. Waldner, Ch. Schlatter & H. Schmid, Helv.
Chim. Acta 52, 15 (1969).
- 27) G.D. Prestwich, R.W. Jones & M.S. Collins, Insect
Biochem. 11, 331 (1981).
- 28) L.B. Bjostd & W.L. Roelofs, J. Biol. Chem. 256,
7936 (1981).
- 29) C. Cardani, C. Fuganti, D. Ghiringhelli, P. Grasselli,
M. Pavan & M.D. Valcurone, Tetrahedron Lett. 30,
2815 (1973).
- 30) H. Schildknecht & W.F. Wenneis, Tetrahedron
Lett. 19, 1815 (1967).
- 31) J. Meinwald, K.F. Koch, J.E. Rogers Jr. & T. Eisner,
J. Am. Chem. Soc. 88, 1590 (1966).
- 32) S.S Duffey & G.G.E. Scudder, Can. J. Zool. 52, 283
(1974); S.S. Duffey, E.W. Underhill & G.H.N. Towers,
Comp. Biochem. Physiol. B 47B, 753 (1974).
- 33) M.H. Benn, A. Leucucha, S. Maxie & S.A. Telang,
J. Insect Physiol. 19, 2173 (1973).
- 34) A.Hefetz & M.S. Blum, Science 201, 454 (1978).
- 35) M. Robiquet, Ann. Chim. 76, 302 (1810).
- 36) R. Porfirio, Rev. Farm. Buenos Aires 73, 17 (1931);
B.H. Iyer & P.C. Guka, J. Indian Inst. Sci. 14a, 31
(1931); W.G. Watter & J.F. Cole, J. Pharm. Sci. 56,
174 (1967); R.B. Salama, Y. Hammouda & I. Gassim,

- J. Pharm. Pharmac. 26, 268 (1974); Y. Hammouda & R.B. Salama, Pharmazie 29, 147 (1974).
- 37) H. Beauregard, Les Insectes Vesicants, Felix Alcan, Paris 1890.
- 38) K. Görnitz, Arb. Phys. Angew. Ent., Berlin-Dahlem, Bd. 4, Nr. 2, 116 (1937).
- 39) M.S. Blum, "Chemical Defenses of Arthropods", Acad. Press, New York 1981.
- 40) J.E. Carrel & T. Eisner, Science 183, 755 (1974).
- 41) J.E. Carrel, Dissertation, Cornell University, Ithaca (USA) 1971.
- 42) E. Kaiser & H. Michl, "Die Biochemie der tierischen Gifte", Deuticke, Wien 1958.
- 43) I. Bloch, "Marquis de Sade, His Life and Works", Castle Books, New York 1943; R. Dahl, "My Uncle Oswald", Penguin Books Ltd., Harmondsworth 1980.
- 44) H.P. Fish, F.W. Reutter & F. Gloor, Schweiz.med. Wschr. 108, 1664 (1978).
- 45) K. Ziegler, G. Schenck, E.W. Krochow, A. Siebert, A. Wenz & H. Weber, Liebigs Ann. Chem. 551, 1 (1942).
- 46) G. Storck, E.E. van Tamelen, L.J. Friedman & A.W. Burgstahler, J. Am. Chem. Soc. 75, 384 (1953).
- 47) W.G. Dauben, C.R. Kessel & K.H. Takemura, J. Am. Chem. Soc. 102, 6893 (1980).

- 48) Ch. Schlatter, E.E. Waldner & H. Schmid,
Experientia 24, 994 (1968).
- 49) H. Günther, E. Ramstad & H.G. Floss, J. Pharm.
Sci. 58, 1274 (1969).
- 50) Ch. Schlatter, A. Dürsteler-Meier & H. Schmid,
Chimia 22, 498 (1968).
- 51) M.G. Peter, W.-D. Woggon, Ch. Schlatter & H. Schmid,
Helv. Chim. Acta 60, 844 (1977).
- 52) M.G. Peter, H.-R. Waespe, W.-D. Woggon & H. Schmid,
Helv. Chim. Acta 60, 1262 (1977).
- 53) W.-D. Woggon, M.G. Peter & H. Schmid, Helv. Chim.
Acta 60, 2288 (1977).
- 54) D. Meyer, Ch. Schlatter, I. Schlatter-Lanz, H. Schmid &
P. Bovey, Experientia 24, 995 (1968).
- 55) J.R. Sierra, W.-D. Woggon & H. Schmid, Experientia
32, 142 (1976).
- 56) T. Eisner, persönliche Mitteilung.
- 57) W.-D. Woggon & J.R. Sierra, Publ. in Vorbereitung.
- 58) R.B. Selander & R.C. Weddle, Ann. Entomol. Soc.
Amer. 62, 27 (1969); R.B. Selander & J.D. Pinto,
J. Kansas Ent. Soc. 40, 396 (1967).
- 59) P.S. Chen in „Biochemistry of Insects", ed. M. Rockstein,
New York-San Francisco-London, 1978, p 145.
- 60) P.S. Chen & H. Baumann, Rev. Suisse Zool. 79, 333 (1972);
H. Baumann & P.S. Chen, Rev. Suisse Zool. 80, 685 (1973).

- 61) H. Baumann, J. Insect Physiol. 20, 2181 (1974).
- 62) H. Baumann, K.J. Wilson, P.S. Chen & R.E. Humbel,
Eur. J. Biochem. 52, 521 (1975).
- 63) W.-D. Woggon, Super 8 Filmmaterial.
- 64) W.-D. Woggon, S.A. Hauffe & H. Schmid, J. Chem. Soc.,
Chem. Commun. 1983, 272.
- 65) J. Piccard, Chem. Ber. 10, 1504 (1877); B. Homulka,
Chem. Ber. 19, 1082 (1886); J. Gadamer, Arch.Pharm. 252,
636 (1914).
- 66) P.W. Dankwortt, Arch. Pharm. 252, 663 (1914).
- 67) M.G. Peter, G. Snatzke, F. Snatzke, K.M. Nagarajan &
H. Schmid, Helv. Chim. Acta 57, 32 (1974).
- 68) A. Dürsteler-Meier, Ch. Schlatter & H. Schmid,
unveröffentlichte Resultate.
- 69) W.-D. Woggon & R. Wiesendanger, unveröffentlichte
Resultate.
- 70) E. von Rudloff, Can. J. Chem. 34, 1413 (1956).
- 71) G. Snatzke & H.W. Fehlhaber, Liebigs Ann. Chem. 663, 123 (1963).
- 72) R.L. Augustine, "Oxidation", Vol. 1, M. Dekker 1969, p.11.
- 73) J.R. Sierra & W.-D. Woggon, Publ. in Vorbereitung.
- 74) K.G. Allen, D.V. Banthorpe, B.V. Charlwood,
O. Ekundayo & J. Mann, Phytochemistry 15, 10 (1976).
- 75) A. Corbella, P. Gariboldi, G. Jommi & C. Scolastico,
J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1969, 634; M. Biollaz &
D. Arigoni, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1969, 633.

- 76) L.F. Tietze, *Angew. Chem.* 95, 840 (1983).
- 77) J. Stöckigt in „Indole and Biogenetically Related Alkaloids“, ed. J.D. Phillipson & M.H. Zenk, Acad. Press, London 1980, p. 113.
- 78) S. Escher, P. Loew & D. Arigoni, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1970, 823.
- 79) A.R. Battersby, S.H. Brown & T.G. Payne, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1970, 827.
- 80) J. Buddrus, *Angew. Chem.* 80, 535 (1968).
- 81) E.E. v. Tamelen, A. Storni, E.J. Hessler & M. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3295 (1963).
- 82) L.F. Fieser & M. Fieser, „Reagents for Organic Synthesis“, Bd. 1, John Wiley & Sons, New York 1967, p. 817.
- 83) G. Storck, P.A. Grieco & M. Gregson, *Tetrahedron Lett.* 1969, 1393.
- 84) L.J. Altman, L. Ash & S. Marson, *Synthesis* 2, 129 (1974).
- 85) H. Schmid & D.A. Yoewell, *Experientia* 20, 250 (1964).
- 86) S. Escher, Dissertation Nr. 4887, ETH-Zürich, 1972.
- 87) H.B. Dunford, D. Dolphin, K.N. Raymond & L. Sieker (ed.), „The Biological Chemistry of Iron“, D. Reidel, Dordrecht, 1982.
- 88) A. Akhila & V. Banthorpe, *Phytochemistry* 19, 1429 (1980).
- 89) K.M. Madyastha, T.D. Meehan & C.J. Coscia, *Biochemistry* 15, 1097 (1976).
- 90) B. Samuelsson, *Angew. Chem.* 95, 854 (1983).
- 91) D.B. Destephano, U.E. Brady & L.B. Woodall, *Prostaglandins* 11, 261 (1976).

- 92) S.S. Tobe & W. Loher, Insect Biochem. 13, 137 (1983).
- 93) W. Loher, I. Ganjian, I. Kubo, D. Stanley-Samuelson & S.S. Tobe, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 78, 7835 (1981).
- 94) B.N.Y. Setty & T.R. Ramaiah, Ind. J. Exp. Biol. 18, 539 (1980).
- 95) W.-D. Woggon & S.A. Hauffe, Publ. in Vorbereitung.
- 96) M.G. Peter, W.-D. Woggon & H. Schmid, Helv. Chim. Acta 60, 2756 (1977).
- 97) J.W. Cornforth, Chem. Soc. Rev. 2, 1 (1973).
- 98) A.J. Birch, M. Kocor, N. Sheppard & J. Winter, J. Chem. Soc. 1962, 1502.
- 99) W.-D. Woggon, F. Ruther & H. Egli, J.Chem. Soc., Chem.Comm. 1980, 706.
- 100) E.J. Corey, N.W. Gilman & B.E. Ganem, J. Am. Chem. Soc. 90, 5616 (1968).
- 101) B.M. Trost, Acc. Chem. Res. 13, 385 (1980).
- 102) U.T. Bhalerao, J.J. Plattner & H. Rapoport, J. Am. Chem. Soc. 92, 3429 (1970).
- 103) J. Meinwald, W.R. Thompson, T. Eisner & D.F. Owen, Tetrahedron Lett. 1971, 3485 ; J. Meinwald, K. Opheim & T. Eisner, Tetrahedron Lett. 1973, 280.
- 104) T.W. Sum & L. Weiler, Tetrahedron 37, 303 (1981).
- 105) D.G. Lee & V.S. Chang, J. Org. Chem. 43, 1532 (1978).
- 106) W.-D. Woggon, Publ. in Vorbereitung.
- 107) A.I. Scott & K. Shishido, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1980, 400.

- 108) D. Seebach, *Synthesis* 1969, 17.
- 109) D. Seebach, E.J. Corey & A.K. Beck, *Chem. Ber.* 107, 367 (1974).
- 110) J.A. Lawson, W.T. Colwell, J.I. DeGraaw, R.H. Peters, R.L. Dehn & M. Tanabe, *Synthesis* 1975, 729.
- 111) L.M. Stephenson & D.R. Speth, *J. Org. Chem.* 44, 4683 (1979).
- 112) F. Bohlmann, R. Zeisberg & E. Klein, *Org. Magn. Reson.* 7, 426 (1975).
- 113) J. Tsuji, *Acc. Chem. Res.* 2, 144 (1969).
- 114) B.M. Trost, *Tetrahedron* 33, 2615 (1977).
- 115) B.M. Trost, P.E. Strege, L. Weber, T.J. Fullerton & T.J. Dietsche, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 3407 (1978).
- 116) B.M. Trost, L. Weber, P.E. Strege, T.J. Fullerton & T.J. Dietsche, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 3416 (1978).
- 117) H.C. Volger, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 88, 225 (1969).
- 118) J.W. Faller, M.E. Thomsen & M.J. Mattina, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2642 (1971).
- 119) G.R. Davies, R.H.B. Mais, S. O'Brien & P.G. Owston, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1967, 1151.
- 120) K. Vrieze, H.C. Volger & P.W.N.M. van Leeuwen, *Inorg. Chim. Acta* 1969, 109.
- 121) R. Mason & D.R. Russell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1966, 26.
- 122) R. Hüttel & H. Schmid, *Chem Ber.* 101, 252 (1968).
- 123) U.T. Bhalerao & H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4835 (1971).

- 124) M.A. Umbreit & K.B. Sharpless, J. Am. Chem. Soc. 99, 5526 (1977).
- 125) P.D. Magnus in "Comprehensive Organic Chemistry", Vol. 13, ed. D. Barton & D. Ollis, Pergamon Press, Oxford 1979, p. 491.
- 126) K.B. Wiberg & S.D. Nielsen, J. Org. Chem. 29, 3353 (1964).
- 127) K.B. Sharpless & R.F. Lauer, J. Am. Chem. Soc. 94, 7154 (1972).
- 128) D. Arigoni, A. Vasella, K.B. Sharpless & H.P. Jensen, J. Am. Chem. Soc. 95, 7917 (1973).
- 129) D.L.J. Clive, Tetrahedron 34, 1049 (1978).
- 130) H.M.R. Hoffmann, Angew. Chem. 81, 597 (1969).
- 131) U. Vögeli & W. von Philipsborn, Org. Magn. Reson. 7, 617 (1975).
- 132) A. Simon & R. Paetzold, Z. Anorg. Allgem. Chem. 303, 53 (1960).
- 133) V. Garsky, D.F. Koster & R.T. Arnold, J. Am. Chem. Soc. 96, 4207 (1974).
- 134) L.M. Stephenson & D.L. Mattern, J. Org. Chem. 41, 3614 (1976).
- 135) W.L. Mock & J.H. McCausland, Tetrahedron Lett. 1968, 391.
- 136) R.F. Heldeweg & H. Hogeveen, J. Am. Chem. Soc. 88, 2341 (1976).
- 137) R.C. Mehrotra & S.N. Mathur, J. Ind. Chem. Soc. 41, 111 (1964).

- 138) R.C. Paul, K.K. Bhasin & R.D. Sharma, Ind. J. Chem. 13, 292 (1975).
- 139) P.C. Gupta, R.C. Mehrotra & S.N. Mathur, J. Ind. Chem. Soc. 42, 814 (1965).
- 140) A. Simon & R. Paetzold, Z. Anorg. Allgem. Chem. 303, 79 (1960).
- 141) B.A. Arbuzov, V.A. Naumov, N.M. Zaripov & L.D. Promicheva, Dokl. Akad. Nauk SSSR 195, 1333 (1970).
- 142) B.A. Arbuzov, I.V. Anonimova, A.N. Vereshchagin & L.K. Yuldasheva, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. 1973, 2324.
- 143) B.A. Arbuzov, L.K. Yuldasheva & I.V. Anonimova, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. 1969, 2712.
- 144) R.J. Gillespie, "Molekülgeometrie", Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- 145) J.G. Pritchard & R.C. Lauterbur, J. Am. Chem. Soc. 83, 2105 (1961).
- 146) P. Haake, J.P. McNeal & E.J. Goldsmith, J. Am. Chem. Soc. 90, 715 (1968).
- 147) A. Marquet, M. Dvolaitzky & D. Arigoni, Bull. Soc. Chim. France 1966, 2956.
- 148) S.J. Angyal & R.J. Young, J. Am. Chem. Soc. 81, 5467 (1959).
- 149) H.J. Schneider & W. Bremser, Tetrahedron Lett. 1970, 5197.
- 150) W. Voelter, E. Breitmeier, G. Jung, T. Keller & D. Hiss, Angew. Chem. 82, 812 (1970).

- 151) J. Briggs, F.A. Hart, G.P. Moss & E.W. Randall,
J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1971, 364.
- 152) O. Lutz in "The Multinuclear Approach to NMR-
Spectroscopy", ed. J.B. Lambert & F.G. Ridell,
D. Reidel, Dordrecht 1983, p. 389.
- 153) C.R.N. Sheppard, H.C.E. McFarlane & W. McFarlane in
"NMR and the Periodic Table", ed. R.K. Harris &
B.E. Mann, Acad. Press, London 1978, p. 402.
- 154) W. Nakanishi, Y. Ikeda & H. Iwamura, Org. Magn.
Reson. 20, 117 (1982).
- 155) H.J. Reich & J.E. Trend, J. Chem. Soc., Chem.
Commun. 1976, 310.
- 156) J.E. Trend, Dissertation, University of Wisconsin,
Madison (USA) 1976.
- 157) G. Kalabin, D.F. Kushnarev, V.M. Bzesovsky & G.A.
Tschmutova, Org. Magn. Reson. 12, 598 (1979).
- 158) I.J. Colquhoun, H.C.E. McFarlane, W. McFarlane,
J.A. Nash, R. Keat, D.S. Rycroft & D.G. Thompson,
Org. Magn. Reson. 12, 473 (1979).
- 159) P. Granger, S. Chapelle & C. Paulmier, Org.
Magn Reson. 14, 240 (1980).
- 160) W. McFarlane & R.J. Wood, J. Chem. Soc.,
Dalton 1972, 1397.
- 161) K.B. Sharpless & T.R. Verhoeven, Aldrichimica
Acta 12, 63 (1979).
- 162) M. Haruna & K. Ito, J. Chem. Soc., Chem. Commun.
1980, 483.

- 163) H.F. van Woerden, H. Cerfontain, C.H. Green & R.J. Reijerkerk, Tetrahedron Lett. 1968, 6107.
- 164) K.K. Andersen, Tetrahedron Lett. 1962, 93.
- 165) U. Folli, D. Iarossi, F. Montanari & G. Torre, J. Chem. Soc. C 1968, 1317.
- 166) G. Solladié & Ch. Mioskowski, Tetrahedron 36, 227 (1980); G.H. Posner, J.P. Mallamo, K. Miura & M. Hulce, Pure & Appl. Chem. 53, 2307 (1981).
- 167) D.R. Rayner, A.J. Gordon & K. Mislow, J. Am. Chem. Soc. 90, 4854 (1968).
- 168) E.G. Miller, D.R. Rayner, H.T. Thomas & K. Mislow, J. Am. Chem. Soc. 90, 4861 (1968).
- 169) M. Oki & H. Iwamura, Tetrahedron Lett. 1966, 2917.
- 170) H. Rheinbolt & E. Giesbrecht, J. Am. Chem. Soc. 69, 644 (1947).
- 171) D.N. Jones, D. Mundy & R.R. Whitehouse, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1970, 86.
- 172) K.B. Sharpless, W.M. Young & R.F. Lauer, Tetrahedron Lett. 1973, 1979.
- 173) W.G. Salmond, M.A. Barta, A.M. Cain & M.C. Sobala, Tetrahedron Lett. 1977, 1683.
- 174) J.B. Lambert in "Topics in Stereochemistry", Vol 6, ed. N.C. Allinger & E.L. Eliel, John Wiley & Sons, New York 1971, p. 19.
- 175) R. Baechler & K. Mislow, J. Am. Chem. Soc. 93, 773 (1971).

- 176) D. Kost, E.M. Carlson & M. Raban, J. Chem. Soc.,
Chem. Commun. 1971, 656.
- 177) H. Kessler, Angew. Chem. 82, 237 (1970).
- 178) D. Felix & A. Eschenmoser, Angew. Chem. 80, 197 (1968).
- 179) A.B. Turner in "Synthetic Reagents", Vol 5, ed.
J.S. Pizey, John Wiley & Sons, New York 1977, p. 193.
- 180) M. Pavan, Pubbl. Ist. Entom. Agr. Univ. Pavia 1975, 1.
- 181) G.W.K. Cavill in "Cyclopentanoid Terpene Derivatives",
ed. W.J. Taylor & A.R. Battersby, M. Dekker
1969, p. 203.
- 182) S.A. Abou-Donia, L.J. Fish & G. Pattenden, Tetra-
hedron Lett. 1971, 4037; L.J. Fish & G. Pattenden,
J. Insect Physiol. 21, 741 (1975).
- 183) G. Vidari, M. DeBernardi, M. Pavan & L. Ragozzino,
Tetrahedron Lett. 1973, 4065.
- 184) K.J. Clark, G.I. Fray, R.H. Jaeger & R. Robinson,
Tetrahedron 6, 217 (1959).
- 185) S.A. Achmad & G.W.K. Cavill, Austral. J. Chem. 18,
1989 (1965).
- 186) H. Inouye, Planta Med. 33, 193 (1978).
- 187) K.M. Madyastha, T.D. Meehan & C.J. Coscia,
Biochemistry 15, 1097 (1976).
- 188) J. Freedman, Tetrahedron Lett. 1975, 3251.
- 189) G.W.K. Cavill & H.D. Locksley, Austral. J. Chem.
10, 352 (1957).
- 190) J. Wolinsky, T. Gibson, D. Chan & H. Wolf,
Tetrahedron 21, 1247 (1965).

- 191) J.W. Cornforth, Tetrahedron 30, 1515 (1974).
- 192) R.B. Turner, J. Am. Chem. Soc. 72, 878 (1950).
- 193) J.M. Pasteels, C. Deroe, B. Tursch, J.C. Braekman,
D. Daloze & C. Hootele, J. Insect Physiol. 19,
1771 (1973).
- 194) B. Tursch, D. Daloze, M. Dupont, J.M. Pasteels &
M.-C. Tricot, Experientia 27, 1380 (1971).
- 195) R. Karlson & D. Losman, J. Chem. Soc., Chem.
Commun. 1972, 626.
- 196) W.A. Ayer & Furuichi, Can. J. Chem. 54, 1494 (1976);
R.V. Stevens & A.W.M. Lee, J. Am. Chem. Soc. 101, 7032 (1979).
- 197) B. Tursch, D. Daloze, J.C. Breakman, C. Hootele & J.M.
Pasteels, Tetrahedron 31, 1541 (1975).
- 198) S.R. Johns, J.A. Lamberton, A.A. Sioumis & H. Soares,
Aust. J. Chem. 27, 2025 (1974).
- 199) E.J. Corey & R.B. Balanson, J. Am. Chem. Soc. 96,
6516 (1974).

